

Aus der Klinik für Innere Medizin III
- Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin -
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm

Quellen und Effekte reaktiver Sauerstoffspezies in Herzmuskelzellen

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Universität des Saarlandes
2014

vorgelegt von Anca Astrid Cura
geb. am 09.01.1983 in Temeschburg

Tag der Promotion: 03. November 2014

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter(in):

2. Berichterstatter(in):

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm, Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. C. Maack, Lehrstuhl für Kardiovaskuläre Physiologie und Bioenergetik und Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Teile der Arbeit wurden mit Genehmigung des Dekans der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes vorab veröffentlicht.

Homburg, 09.01.2014

Anca Astrid Cura

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden von mir selbst nach Einarbeitung durch Herrn Universitäts-Prof. Dr. med. C. Maack in den Forschungslaboren der Klinik für Innere Medizin III der Universitätskliniken Homburg (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm) durchgeführt.

Anca Astrid Cura

Inhaltsverzeichnis

1	Verwendete Abkürzungen	6
2.	Zusammenfassung/Summery	11
2.1.	Quellen und Effekte reaktiver Sauerstoffspezies in Herzmuskelzellen	11
2.2.	Summary – Sources and effects of reactive oxygen species in cardiac myocytes	13
3.	Einleitung	15
3.1.	Definition der Herzinsuffizienz	15
3.2.	Klinische Einteilung der Herzinsuffizienz	16
3.3.	Ätiologie der Herzinsuffizienz	18
3.4.	Pathogenese der Herzinsuffizienz	20
3.4.1.	Neuroendokrine Aktivierung, oxidativer Stress und maladaptives Remodeling	20
3.4.2.	Regulation der oxidativen Phosphorylierung durch ADP und Ca^{2+}	23
3.4.3.	Mechanismen erhöhter mitochondrialer ROS-Produktion bei Herzinsuffizienz	24
3.4.4.	Einfluss von $[\text{Na}^+]_i$ auf mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und ROS-Produktion	24
3.4.5.	Mögliche Regulation mitochondrialer ROS-Produktion über ET-1?	26
3.5.	Ziel dieser Arbeit	28
4.	Materialien und Methoden	30
4.1.	Verwendete Lösungen und Stoffe	30
4.2.	Isolation von Herzmuskelzellen aus Meerschweinchen-Herzen	33
4.3.	Bestimmung der Zellverkürzung in isolierten Herzmuskelzellen	33
4.4.	Bestimmung von intrazellulären Ionenverhältnissen und Membranspannungen mittels Fluoreszenz-Imaging und Patch-Clamp-Technik	40
4.4.1.	Die Patch-Clamp-/Fluoreszenz-Imaging-Anlage und das	

- Verfahren	40
4.4.2. Fluoreszenz-Farbstoffe	42
5. Ergebnisse	46
5.1. Effekte exogener ROS auf die elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen	46
5.2. Effekte von ET-1 auf elektromechanische Kopplung, mitochondriale Energetik und ROS-Produktion	50
5.2.1. Effekte von ET-1 auf Zellverkürzung, $[Ca^{2+}]_c$ und $[Na^+]_i$	50
5.2.2. Effekte von ET-1 auf die Zellverkürzung mittels Konzentrations- Wirkungs-Kurve und Langzeitverlauf	55
5.2.3. Effekte von ET-1 und Ang II auf die ROS-Produktion	57
5.2.4. Effekte von ET-1 auf die NADPH-Oxidase-Aktivität in Kardiomyozyten	59
6. Diskussion	61
6.1. Effekte exogener ROS auf die elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik	61
6.2. Quellen einer intrazellulären ROS-Produktion in Kardiomyozyten	66
7. Quellenangaben	70
8. Danksagung	78
9. Eigene Veröffentlichungen/Arbeiten	79

1. Verwendete Abkürzungen

α	Alpha
AC	Adenylatcyklase
ACE	Angiotensin-Converting-Encyme
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosin-Diphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
Ang II	Angiotensin II
ANP	atrialess natriuretisches Peptid
APO	Apocynin
AR	Adrenorezeptoren
ASK	Apoptosis signal-regulating Kinase
AT ₁	Angiotensin-1
AT ₁ -R	Angiotensin 1-Rezeptor
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPase	Adenosin-Triphosphatase
AV	Atrioventrikulär
β	Beta
BNP	brain natriuretic peptid
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	zweiwertiges Calciumkation
[Ca ²⁺] _c	cytosolische Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
Ca ²⁺ ATPase	Calcium-ATPase
CHE	Chelerythrine, PKC-Inhibitor
Con	Kontrolle
δ	Delta
Δ	Delta
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DAG	Diacylglycerol

Verwendete Abkürzungen

DCM	dilatative Cardiomyopathie
dC/dt	Departure-Velocity = Verkürzungsgeschwindigkeit
+dF/dt	Kontraktionsgeschwindigkeit (Kraft/Zeit)
-dF/dt	Relaxationsgeschwindigkeit (Kraft/Zeit)
dL/dt	Return-Velocity = Relaxationsgeschwindigkeit
+dS/dt	Verkürzungsgeschwindigkeit
-dS/dt	Relaxationsgeschwindigkeit
div	divergent
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium = standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen
DPI	Diphenyleniodinium
ε	Epsilon
EDTA	Ethyldiamintetra-Essigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal-related kinase
ET-1	Endothelin-1
ET _A -R	Endothelin-1-Rezeptor
ETC	Elektronentransfer-Zyklus
F _K	Kontraktionskraft
FCCP	Trifluorocarbonylcyanid Phenylhydrazon
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenkation
FS	fractional shortening = prozentuale Zellverkürzung
FURA-2	Aminopolycarboxylsäure, Fluoreszenzfarbstoff zur Calcium-Messung
g/mg	Gramm/Miligramm
G _i	inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPX	Glutathionperoxidase
G _s	stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein
H ⁺	einwertiges Wasserstoffkation
H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid = Salzsäure

Verwendete Abkürzungen

HFpEF	Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction (Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion=diastolische Herzinsuffizienz)
HFrEF	Heart Failure with a Reduced Ejection Fraction (Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion=systolische Herzinsuffizienz)
HI	Herzinsuffizienz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCM	hypertrophe obstruktive Cardiomyopathie
Hz	Hertz (1/s)
HZV	Herz-Zeit-Volumen
ICM	Ischämische Cardiomyopathie
IMAC	Inner Membrane Anion Channel
INDO-1 AM	2-[4-(bis(Carboxymethyl)Amino)-3-[2-[2-(bis(Carboxymethyl)Amino)-5-Methylphenoxy]Ethoxy]Phenyl]-1H-Indole-6-Carboxylsäure, Fluoreszenzfarbstoff zur Calcium-Messung
InsP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ISO	Isoprenalin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
κ	Kappa
K ⁺	einwertiges Kaliumkation
K _{ATP} (mito)	(mitochondriale) Kalium-ATPase
KCl	Kaliumchlorid
KFB	Kraft-Frequenz-Beziehung
K-Glutamat	Kaliumglutamat
KHK	Koronare Herzerkrankung
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
L-NAME	NG-Nitro-L-Argininmethylester
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	Mol
μm	Mikrometer

Verwendete Abkürzungen

$\mu\text{m/s}$	Mikrometer pro Sekunde
$\mu\text{mol/l}$	Mikromol pro Liter
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
mCU	mitochondrialer Calcium-Uniporter
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MG	Molekulargewicht
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mn-SOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mol/l	Mol pro Liter (auch M/l)
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Experimente
Na^+	einwertiges Natriumkation
$[\text{Na}^+]_i$	intrazelluläre Natriumkonzentration
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-H + H^+
NADPH	Nicotinamid- Adenin-Dinukleotidphosphat
Na-HEPES	Natrium-2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
NaOH	Natriumhydroxid
Na-Pyruvat	Natriumpyruvat
NCX (rev)	(reverser) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NF- κB	Nuklear-Faktor κB
NHE	Na^+/H^+ -Austauscher
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol pro Liter
NO	Stickstoffmonoxid
NT-pro-BNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptid
NTA	Nitrilotriessigsäure
NYHA	Gradeinteilung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association

Verwendete Abkürzungen

O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
OH ⁻	Hydroxylradikal
ψ	Psi
pA	Pikoampere
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PGF	Prostaglandin F
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Phospholipase C
PL	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, PKC-Aktivator
PTP	Permeability Transition Pore
R _m	Relaxationsgeschwindigkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma, zur Familie der Proteinkinasen gehörendes Raf-Protein mit verschiedenen Isoformen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TGF-β	transforming growth factor β
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester
V _m	Verkürzungsgeschwindigkeit

2. Zusammenfassung

2.1. Quellen und Effekte reaktiver Sauerstoffspezies in Herzmuskelzellen

Bei chronischer Herzinsuffizienz tragen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zur Pathogenese der Herzinsuffizienz bei. Darüber hinaus kommt es bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu einer neuroendokrinen Aktivierung, die neben der sympathischen Aktivierung auch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie erhöhte Plasma-Spiegel für Endothelin umfasst. Die genauen Auswirkungen von ROS auf die elektromechanischen Kopplung sowie die Quellen von ROS sind hierbei unvollständig verstanden. Unklar ist darüber hinaus, ob Endothelin eine vermehrte Produktion von ROS in Kardiomyozyten herbeiführt, und falls ja, ob dies primär über die Aktivierung der NADPH-Oxidase oder eine Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion erfolgt. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren es daher,

- 1) die Effekte von ROS auf die elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik an isolierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten zu untersuchen und
- 2) näheren Aufschluss über die Mechanismen zu erlangen, über die Endothelin ggf. eine Erhöhung der zellulären ROS-Produktion herbeiführt.

Experimente wurden an isolierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten sowie an Homogenaten von Meerschweinchen-Myozyten durchgeführt. Die kombinierte Applikation von H_2O_2 (1mmol/l) und Fe^{3+} -NTA (0,1 mmol/l) zur Produktion von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) für 15 Minuten simuliert die schubartige passagere ROS-Freisetzung nach myokardialer Ischämie/Reperfusion und zeigte in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe an humanen Herzmuskelstreifen das typische Phänomen des „myokardialen Stunning“, welches durch einen Anstieg der diastolischen Spannung und Abnahme der Kontraktionskraft gekennzeichnet ist. An isolierten Kardiomyozyten verursachte dieses Protokoll ebenfalls einen Anstieg der diastolischen Spannung der Kardiomyozyten, eine Abnahme der fraktionellen Zellverkürzung, einen Anstieg der diastolischen Calcium-Konzentration sowie eine Verkürzung des Aktionspotentials, was mit einer partiellen Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials sowie einer leichten Hyperpolarisation des sarkolemmalen Membranpotentials assoziiert war. Ein möglicher Mechanismus für

die Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials könnte hierbei die Oxidation von NADH und NADPH sein, was zu einer Verarmung an Elektronenlieferanten für die Atmungskette (NADH) und somit eine Verringerung der ATP-Produktion mit nachfolgender Aktivierung sarkolemmaler ATP-abhängiger Kaliumkanäle führen könnte, was die Hyperpolarisation des sarkolemmalen Membranpotentials erklären könnte. Länger anhaltende Exposition der Zellen an ROS führte zu einer cytosolischen Calcium-Überladung, die in einer mitochondrialen Calcium-Überladung mit anschließender Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials führte, welche a. e. auf die Calcium- und ROS-induzierte Aktivierung des mitochondrialen permeability transition pore (mPTP) zurückzuführen sein könnte. Diese Daten gewähren Einblicke in die ROS-induzierte Beschädigung der mitochondrialen und cytosolischen Ionenhomöostase, die zum energetischen und funktionellen Defizit und ggf. Zelltod führen können.

Endothelin führte im picomolaren Bereich zu einer deutlichen Steigerung der fraktionellen Zellverkürzungsamplitude in Myozyten, jedoch nicht zu einer Steigerung der Amplitude der cytosolischen Calcium-Transienten. Auch kam es durch Endothelin in isolierten, elektrisch stimulierten Kardiomyozyten zu keiner nennenswerten Steigerung der zellulären ROS-Produktion. An homogenisierten Kardiomyozyten führte Endothelin zwar zu einer leichten Stimulation der NADPH-Oxidase, diese war unter diesen experimentellen Bedingungen jedoch schon ausgeprägt voraktiviert, was eine deutliche Steigerung durch Endothelin ggf. verschleiern könnte. Endothelin führte weiterhin nach 30-40 Minuten zu vermehrten zellulären Arrhythmien. Zusammengefasst konnten unsere Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Endothelin-medierte Steigerung der zellulären ROS-Produktion liefern, was somit im Gegensatz zu einigen publizierten Studien steht. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse jedoch, dass durch die alleinige Steigerung der Stimulationsfrequenz in Herzmuskelzellen die ROS-Produktion zunahm.

Zusammengefasst liefern die vorliegenden Daten somit Hinweise auf die Mechanismen, die bei der Reperfusion ischämischen Myokards myokardiales „Stunning“ induzieren können, allerdings konnten wir keinen Hinweis auf eine vermehrte endogene myozytäre ROS-Produktion durch Endothelin nachweisen.

2.2. Summary

Sources and effects of reactive oxygen species in cardiac myocytes

In chronic heart failure reactive oxygen species (ROS) contribute in the pathogenesis of heart failure. Furthermore, in patients with heart failure, neuroendocrine activation occurs which includes the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system as well as increased plasma levels of endothelin. The exact effects of ROS on excitation-contraction coupling and the sources of ROS, however, are incompletely understood. Moreover, it is unclear whether endothelin induces an increased production of ROS in cardiomyocytes, and if so, whether this occurs primarily through the activation of NADPH-oxidase or an increase in mitochondrial ROS-production. Therefore, the objectives of this study were

- 1) to investigate the effects of ROS on excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics in isolated guinea-pig cardiomyocytes and
- 2) to further clarify whether endothelin increases cellular ROS production and if so, by which mechanisms this is achieved.

Experiments were performed on isolated guinea-pig cardiomyocytes as well as homogenates of guinea pig myocytes. In previous experiments of the working group, the combined application of H_2O_2 (1 mmol/l) and Fe^{3+} -NTA (0.1 mmol/l) for the production of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) for 15 minutes (to simulate a transient ROS-release that occurs after myocardial ischemia/reperfusion) and showed the typical phenomenon of "myocardial Stunning" in human myocardium, which is characterized by an increase in diastolic tension and decrease in force of contraction. In isolated cardiomyocytes this protocol also caused an increase in diastolic tension of the cardiomyocytes, a decrease in fractional cell shortening, an increase in diastolic calcium concentration and a shortening of the action potential, which is associated with a partial dissipation of the mitochondrial membrane potential and a slight hyperpolarization of the sarcolemmal membrane potential. A possible mechanism for the dissipation of the mitochondrial membrane potential could be the oxidation of NADH and NADPH, which could decrease ATP production and thus, induce the subsequent activation of sarcolemmal ATP-

dependent potassium channels. This may explain the hyperpolarization of the sarcolemmal membrane potential. Prolonged exposure of cells to ROS resulted in a cytosolic calcium overload, which resulted in a mitochondrial calcium overload with subsequent dissipation of the mitochondrial membrane potential, which most likely could be related to a calcium- and ROS-induced activation of the mitochondrial permeability pore (mPTP). These data provide insights into the ROS-induced damage of mitochondrial and cytosolic ion homeostasis, which can possibly lead to cell death and functional deficits and energetics.

In the picomolar range, endothelin led to a significant increase in fractional cell shortening amplitude in myocytes, but not to an increase in the amplitude of the cytosolic calcium transients. Furthermore, in isolated, electrically stimulated cardiomyocytes, no appreciable increase in cellular ROS-production could be detected in response to endothelin. In homogenized cardiomyocytes, endothelin led to a slight increase of NADPH-oxidase activity. However, we noticed that the NADPH oxidase under the experimental conditions we used was already pre-activated by protein kinase C, since the PKC inhibitor chelerythrine led to a 50% reduction of NADPH oxidase activity. Thus, this pre-activation of NADPH oxidase may have obscured some of the effects of endothelin in cardiac myocytes. Taken together, our results could not provide any evidence of endothelin-mediated increase in cellular ROS production, which is in contrast to some published studies available. In addition, however, the results showed that the sole increase in stimulation rate in cardiac myocytes increased ROS-production.

In summary, the available data thus provide novel insight into the mechanisms of myocardial “stunning” which occurs after ischemia/reperfusion. However, we could not detect any evidence for a direct increase of cellular ROS production through endothelin.

3. Einleitung

3.1. Definition der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein großes weltweites Gesundheitsproblem und eine echte Volkserkrankung. Die Rate der Neuerkrankungen liegt bei 1-4/1000 Neuerkrankungen pro Jahr, dabei verdoppelt sich ab dem 45. Lebensjahr die Inzidenz jedes Jahrzehnt. Bereits jeder fünfte Amerikaner im Alter von 40 Jahren wird im Laufe seines Lebens eine Herzinsuffizienz entwickeln⁶⁹. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt insgesamt nur etwa 40-50 % und bei schweren Formen der Herzinsuffizienz (NYHA Grad IV) überlebt etwa die Hälfte der Patienten das erste Jahr nicht. Sie ist der häufigste Grund für eine Krankenhausaufnahme in Deutschland und verursachte hierdurch im Jahr 2006 Kosten von fast 3 Milliarden Euro⁸¹. Zwar ist die alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz der Herzinsuffizienzfälle nicht weiter angestiegen, jedoch ist sowohl die Gesamtüberlebensrate der Herzinsuffizienzpatienten als auch die Anzahl der Patienten, welche älter als 65 Jahre sind, deutlich gestiegen. Dies hat zur Folge, dass die Gesamtanzahl der Herzinsuffizienzpatienten weiterhin steigend ist⁹⁴. Durch den Einsatz von ACE-Hemmer und Beta-Blocker entstand im Laufe der 1990er Jahre und im neuen Jahrtausend ein Wandel in der Therapie der Erkrankung und eine deutliche Verbesserung der Prognose⁹³.

Allerdings hat es im letzten Jahrzehnt nur noch geringe medikamentöse Verbesserungen der Therapie der Herzinsuffizienz gegeben. Das genauere Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz ist daher wichtig, um neue Behandlungskonzepte zu einer weiteren Verbesserung der Therapie einer Erkrankung zu entwickeln, die immer noch eine inakzeptabel hohe Sterblichkeit aufweist. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf den Mechanismen und Konsequenzen des oxidativen Stresses im Herzen, da diesem eine wichtige kausale Rolle bei der Entwicklung und dem Progress der Herzinsuffizienz zugeschrieben wird⁸².

3.2. Klinische Einteilung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein Syndrom, welches klinisch definiert wird durch Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit und Belastungsintoleranz sowie klinische Zeichen wie Ödeme, Herzrasen oder pulmonale Rasselgeräusche. Weiterhin lässt sich eine Herzinsuffizienz hämodynamisch definieren als das Unvermögen des Herzens, den Körper in Ruhe oder bei Belastung mit genügend Blut und somit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Bei der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion ist der Patient zwar beschwerdefrei, es lässt sich jedoch eine kardiale Dysfunktion objektivieren⁵⁰.

Die Unterteilung der Herzinsuffizienz kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen, wobei diese auch überlappend vorliegen können:

- **Zeitlich:**
 - Akut: Entwicklung binnen Minuten bis Stunden
 - Chronisch: Entwicklung über Tage bis Monate
- **Pathogenese:**
 - **Vorwärtsversagen (*forward failure*):** kardiales Pumpversagen und dadurch bedingte verminderte systemische Blutversorgung
 - Low-Output-Failure: Kontraktionsstörung des Herzens und damit Unvermögen, das vom Körper benötigte Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten.
 - High-Output-Failure: Seltener Form des Vorwärtsversagens mit pathologisch erhöhtem zirkulatorischen Bedarf des Körpers, welchem das gesunde Herz nicht gerecht wird und aufgrund der stark erhöhten Mehrarbeit im Verlauf insuffizient wird (Sepsis, Hyperthyreose, Anämie, hämodynamisch relevante AV-Fistel).
 - Kardiogener Schock: Maximale Ausprägung des Vorwärtsversagens mit ausgeprägter Hypotonie und reduziertem Herzzeitvolumen bei stark erhöhten Füllungsdrücken. Sehr hohe Mortalitätsrate (>70 %).
 - **Rückwärtsversagen (*backward failure*):** Rückstau von Blut in den Lungenkreislauf und die Körperperipherie (=Niederdrucksystem)

- **Pumpfunktion:**
 - HFpEF: Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer (LV) Ejektionsfraktion (=diastolische Herzinsuffizienz)
 - HFrEF: Herzinsuffizienz mit verminderter LV Ejektionsfraktion (=systolische Herzinsuffizienz)
- **Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit:**
 - Kompensiert: kaum klinische Beschwerden mit keiner oder geringer Leistungsminderung
 - Dekompensiert: deutliche Leistungsminderung, ausgeprägte Symptome
- **Lokalisation:**
 - Linksherzinsuffizienz
 - Rechtsherzinsuffizienz
 - Biventrikuläre (=globale) Herzinsuffizienz⁹³

3.3. Ätiologie der Herzinsuffizienz:

Die Ursachen einer akuten Herzinsuffizienz sind vielfältig:

- **Myogen:**
 - akuter Myokardinfarkt
 - Cardiomyopathie (dilatativ, ischämisch, restriktiv, hypertensiv, septisch oder endokrin-metabolisch)
 - Akute Myokarditis
 - Myokardkontusion
 - Pharmakaintoxikationen (v.a. mit negativ inotropem Effekt)
 - Hypoxie
- **Mechanisch:**
 - Stenose oder Insuffizienz der Herzklappen
 - Akute Insuffizienzvitien (Papillarmuskelabriss, Prothesendysfunktion, Endokarditis, Aortendissektion)
 - HOCM
 - Septumdefekt
 - Ventrikelruptur
 - Intrakavitäre Flussbehinderungen
- **Rhythmogen:**
 - Bradykardie
 - Tachykardie
- **Akute Füllungsbehinderung:**
 - Perikardtamponade
 - Pericarditis constrictiva

Nach Behebung der ursächlichen Störung ist die akute Herzinsuffizienz dabei prinzipiell reversibel¹⁶.

Die chronische Herzinsuffizienz wird hinsichtlich der LV-Funktion in eine systolische und eine diastolische Herzinsuffizienz eingeteilt (HFrEF und HFpEF,

entsprechend „**Heart Failure with reduced (oder preserved) Ejection Fraction**“¹⁸). Typisch für die HFpEF ist das Vorliegen von Symptomen einer Herzinsuffizienz bei normalem LV enddiastolischem Volumen und normaler systolischer Funktion. Die Symptome der Herzinsuffizienz (insbes. linkskardiale Stauungssymptomatik mit Luftnot bei erhöhtem LV Füllungsdruck) werden durch eine eingeschränkte Relaxationsfähigkeit des Herzens verursacht, deren genaue Ursachen derzeit noch nicht vollständig verstanden sind (myofilamentäre versus extrazelluläre Defekte oder beides). Etwa die Hälfte der Fälle einer Herzinsuffizienz entsprechen einer HFpEF, die Prognose ist ähnlich schlecht wie bei HFrEF und es sind insbesondere ältere, weibliche Patienten betroffen, häufig in Assoziation mit Hypertonie, Adipositas und Vorhofflimmern und selten mit einer relevanten KHK¹⁹. Im Gegensatz dazu findet sich bei Patienten mit HFrEF häufiger eine ischämische Genese. Die Behandlungsoptionen für HFpEF sind derzeit limitiert: bisher zeigte keines der bei HFrEF effektiven Medikamente (β -Blocker, ACE-Hemmer, AT1-Antagonist, Aldosteron-Antagonisten) einen prognostischen Benefit bei Patienten mit HFpEF^{29, 37}.

Die systolische Herzinsuffizienz wird hinsichtlich ihrer Genese in eine ischämische (ICM) oder nicht-ischämische (oder auch dilatative) Kardiomyopathie unterteilt (DCM). Bei der ICM liegt eine relevante koronare Herzkrankheit, häufig in Assoziation mit einem Myokardinfarkt, vor. Bei der DCM sind ein länger bestehender arterieller Hypertonus, abgelaufene Herzmuskelentzündungen (Myokarditiden), toxische Einflüsse (z.B. Alkohol) und Klappenvitien ursächlich beteiligt. Darüber hinaus fallen hierunter auch primäre Kardiomyopathien, die genetisch bedingt sind (20-30%) oder deren Ursache letztlich ungeklärt bleibt (bis zu 50%). Die DCM tritt gehäuft im mittleren Lebensalter auf, dabei bevorzugt bei Männern.

3.4. Pathogenese der Herzinsuffizienz

3.4.1. Neuroendokrine Aktivierung, oxidativer Stress und maladaptives Remodeling

Bei der chronischen Herzinsuffizienz werden verschiedene neuroendokrine Hormonsysteme aktiviert. Eine besondere Rolle spielen hier das sympathische Nervensystem, erhöhte Konzentrationen des gefäßverengend wirkenden Hormons Endothelin (ET-1) sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)^{68, 89}. Diese Hormone führen über die Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) kardiomyozytäre Umbauprozesse (*Remodeling*) herbei, welche in vielen Fällen über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mediert werden. So führt sowohl die Stimulation von α -¹⁰³ und β -Adrenozeptoren⁸³ (AR), Angiotensin- (AT₁-R)^{72, 86, 100}, Endothelin- (ET_A-R)²⁸ und Mineralokortikoid- (MR) Rezeptoren⁹⁹ zu einer cytosolischen Produktion von ROS. Im Plasma^{14, 31} und der Perikardflüssigkeit⁷⁵ von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz treten vermehrt ROS auf, wobei das Ausmaß des oxidativen Stress mit dem Ausmaß der linksventrikulären Dysfunktion korreliert^{14, 31, 75}. Die wichtigsten myozytären Quellen für ROS sind die membrangebundene NADPH-Oxidase⁷², die Mitochondrien^{51, 52}, die Xanthin-Oxidase^{21, 34} und entkoppelte NO-Synthasen¹⁰⁵. Diese produzieren Superoxidradikale (O₂⁻), welche zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikalen (OH[•]) umgewandelt werden⁵¹. Die zellulären Effekte von ROS sind vielfältig und reichen von der direkten Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung^{36, 101} über die Induktion protektiver Mechanismen im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung^{12, 43, 109} bis zur Aktivierung adaptiver und maladaptiver Mitogen-aktivierter Protein- (MAP-) Kinasen⁴⁰ sowie der Induktion von Apoptose^{97, 98}. Insbesondere die Aktivierung maladaptiver MAP-Kinasen sowie die Induktion von Apoptose stehen in direkter kausaler Beziehung zum LV-Remodeling^{40, 78, 117}.

Die Regulation myozytärer ROS-Produktion ist komplex und unvollständig geklärt. ET-1 und Angiotensin II (Ang II) binden an ET_A-R und AT₁-R, welche über G_{q/11} an die Phospholipase C koppeln und hier die Produktion von Diacylglycerol⁹⁶ und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP₃) hervorrufen⁵⁹. DAG stimuliert die Protein-

Kinase C (PKC), welche durch die Translokation verschiedener Isoenzyme zum einen die NADPH-Oxidase (in nicht-kardialen Zelltypen durch die PKC δ ^{7, 104}), zum anderen mitochondriale (mito) K_{ATP}-Kanäle aktiviert (durch mitochondriale Translokation von PKC ϵ ^{43, 79}). Auch Aldosteron aktiviert über Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR) PKC-vermittelt die NADPH-Oxidase⁹⁹. Neuere Daten suggerieren, dass die AT₁-Rezeptor vermittelte ROS-Produktion über die Aktivierung von mitoK_{ATP}-Kanälen eine weitere, mitochondriale ROS-Produktion hervorruft, welche die MAP-Kinasen JNK, p38 und ASK phosphoryliert, während MEK1/2, ERK1/2 und Raf1 ROS-unabhängig phosphoryliert wurden¹⁰⁰. Frühere Studien zeigten bereits, dass eine ROS-induzierte ROS-Freisetzung aus Mitochondrien, die über den *inner membrane anion channel* (IMAC)^{4, 6} oder den *permeability transition pore* (PTP)¹²⁴ vollzogen wird, zu einer koordinierten, z.T. reversiblen Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führen kann. Diese bedingt durch temporäres Sistieren der ATP-Produktion eine Aktivierung sarkolemmaler K_{ATP}-Kanäle, welche die Aktionspotentialdauer und somit die Erregbarkeit einzelner Zellen beeinflussen⁶ und (bei lokaler Heterogenität dieses Phänomens) kardiale Arrhythmien auslösen kann⁴. Ein Absinken der zellulären ATP-Produktion beeinträchtigt darüber hinaus ATP-abhängige Iontentransporter, insbesondere die Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), was unmittelbar die kardiale Kontraktilität beeinträchtigen kann¹¹¹. Durch eine anhaltende Dissipation des $\Delta\Psi_m$ und die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol werden Kaspasen aktiviert, die Apoptose induzieren^{97, 98}.

Diese Daten zeigen deutlich die engen Zusammenhänge zwischen myozytärer ROS-Produktion, elektromechanischer Kopplung, Aktivierung adaptiver und maladaptiver Kinasen sowie der Induktion von Apoptose. Allerdings wurde in den meisten Studien bisher die kardiomyozytäre ROS-Produktion entweder *indirekt* bestimmt (z.B. durch Detektion der Lipidperoxidation^{72, 100} oder Verwendung von Antioxidantien⁸³), oder aber ihre *direkte* Bestimmung an Myokardhomogenaten^{72, 86} oder quieszenten Kardiomyozyten durchgeführt^{28, 99, 103}. Jedoch herrscht in homogenisiertem Gewebe oder quieszenten Kardiomyozyten ein nur geringer Energiebedarf und somit ein ebenfalls geringer O₂-Verbrauch. In „schlagenden“

Myozyten hingegen steigen Energie- und O₂-Verbrauch deutlich an⁴¹, da ATP durch oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Atmungskette generiert werden muss. Allein durch elektrische Stimulation von Herzmuskelzellen nahm die intrazelluläre ROS-Produktion frequenzabhängig zu⁴¹. An kultivierten Rattenmyozyten induzierte Noradrenalin β_1 -AR-mediiert Apoptose, wobei elektrische Stimulation der kultivierten Myozyten die pro-apoptotische Potenz von Noradrenalin um den Faktor 100 steigerte⁵. Diese Daten veranschaulichen, dass die Bestimmung einer Rezeptor-vermittelten ROS-Produktion die Aspekte der elektromechanischen Kopplung und der oxidativen Phosphorylierung berücksichtigen muss.

3.4.2. Regulation der oxidativen Phosphorylierung durch ADP und Ca²⁺

Die wichtigsten Prozesse der oxidativen Phosphorylierung sind in **Abbildung 1** zusammengefasst. Acetyl-CoA geht als Substrat in den Citratzyklus ein, in dem oxidiertes NAD⁺ durch Dehydrogenasen zu NADH reduziert wird. NADH gibt je ein Elektron an die Atmungskette ab, und sequenzielle Redoxreaktionen an den Komplexen I, III und IV ermöglichen die Translokation von Protonen (H⁺) über die innere mitochondriale Membran. Hierdurch wird das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m \approx -180$ mV) etabliert, welches die Treibkraft für den H⁺-Rückfluss über die F₁/F₀-ATPase darstellt, an welcher ATP aus ADP und P_i synthetisiert wird. Die Elektronen reduzieren Sauerstoff (O₂) zu Wasser (H₂O). Unvollständige Reduktion von O₂, insbesondere an den Komplexen I und III, erzeugt das Superoxid-Radikal ($\cdot\text{O}_2^-$). Unter physiologischen Bedingungen wird $\cdot\text{O}_2^-$ in der Matrix durch die Mn²⁺-abhängige Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) zu H₂O₂, und dieses durch die Glutathion-Peroxidase (GPX) und Peroxiredoxin zu H₂O entgiftet. Die oxidative Phosphorylierung wird durch Ca²⁺ und ADP reguliert^{25, 26}. Ca²⁺, welches während cytosolischer Ca²⁺-Transienten über den mitochondrialen Ca²⁺-Uniporter (MCU) in die Matrix gelangt⁷⁰, stimuliert 3 Schlüsselenzyme des Citratzyklus und somit die Reduktion von NADH, welches für den Elektronentransfer über die Atmungskette zur Verfügung steht. Auf der

anderen Seite aktiviert ADP, welches insbesondere durch ATP-Hydrolyse während der elektromechanischen Kopplung entsteht, die F_1/F_0 -ATPase zu vermehrter ATP-Generation, wodurch $\Delta\Psi_m$ dissipiert wird. Um $\Delta\Psi_m$ konstant zu halten, werden Elektronen von NADH an die Atmungskette abgegeben, wodurch NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Somit regulieren Ca^{2+} und ADP während variierender myozytärer Arbeitsbelastungen komplementär (von *upstream* und *downstream*) die Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung und gewährleisten gleichzeitig die Stabilität der zellulären ATP/ADP- und NADH/ NAD^+ -Quotienten^{25, 26}.

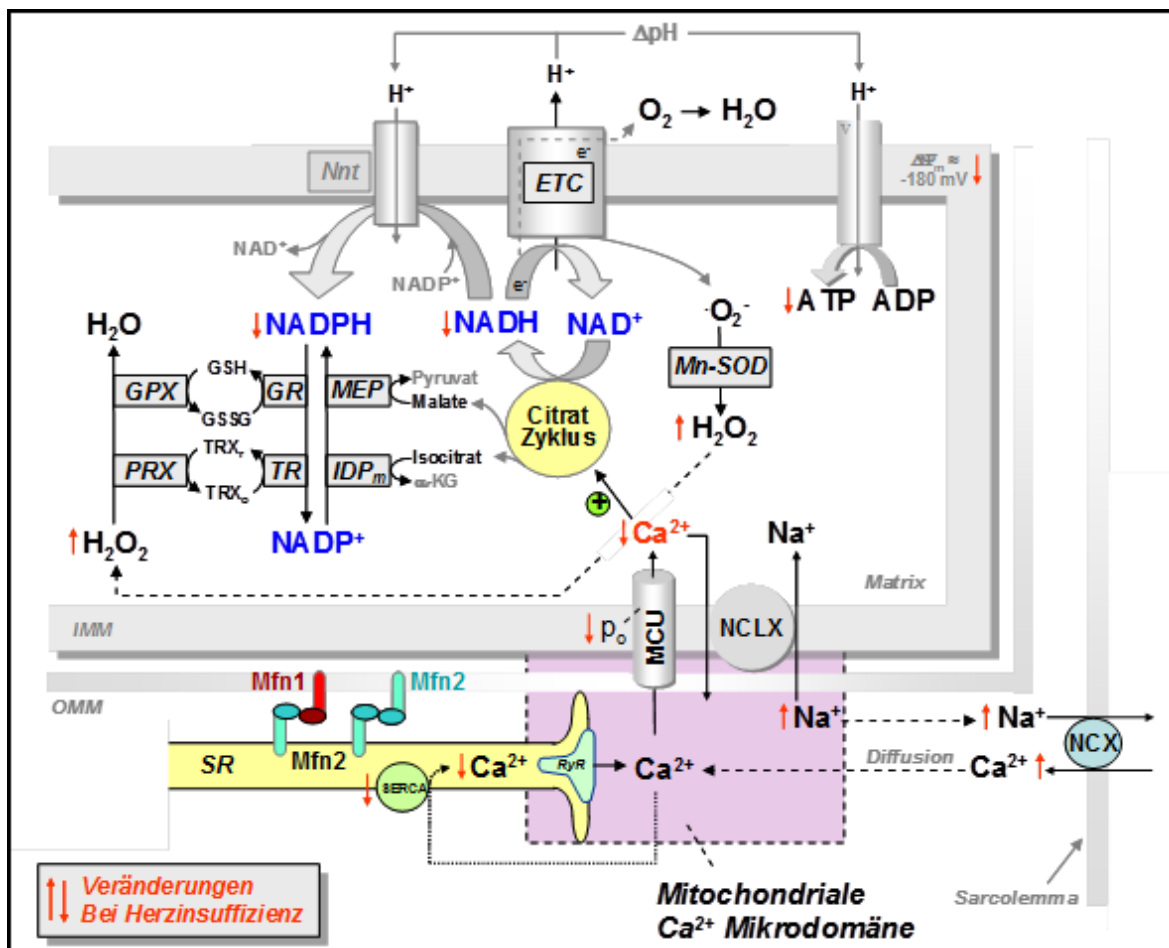


Abbildung 1: Regulation der oxidativen Phosphorylierung und ROS Produktion durch NAD(P)H, Ca^{2+} und Na^+ . Der Citratzyklus mediert die Regeneration von oxidiertem NAD^+ zu NADH, welches Elektronen an die Atmungskette abgibt. Dort wird durch den Elektronenfluss ein Protonengradient erzeugt, der die Treibkraft für ATP Produktion an der F_1/F_0 -ATPase darstellt. Auch die Regeneration der antioxidativen Kapazität ist an den Citratzyklus gekoppelt, da die Reduktion von NADPH durch Enzyme vollzogen wird, die ihre Substrate aus dem Citratzyklus beziehen. Schlüssel-Enzyme des Citratzyklus werden durch Ca^{2+} stimuliert. Die Abbildung zeigt schematisch die Rolle verschiedener Ionenkanäle für cytosolische und mitochondriale Ca^{2+} - und Na^+ -Homöostase sowie deren Auswirkung auf den mitochondrialen Redoxstatus, Energie-Produktion und die Produktion von ROS. $\Delta\Psi_m$, Mitochondriales Membranpotential; Mn-SOD, Mn²⁺-abhängige Superoxid Dismutase; PRX, Peroxiredoxin; GPX, Glutathion Peroxidase; TRX_{r/o}, reduziertes/oxidiertes Thioredoxin; GSH/GSSG, reduziertes/oxidiertes Glutathion; TR, Thioredoxin Reduktase; GR, Glutathion Reduktase; IDP_m, mitochondriale $NADP^+$ -abhängige Isocitrat Dehydrogenase; MEP, Malat-Decarboxylase; α -KG, α -Ketoglutarat; MCU und NCLX, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter und Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher. ETC: Elektronentransfer-Zyklus. Abb. modifiziert nach Nickel, A., Löffler, J., Maack, C. (2013). "Myocardial energetics in heart failure." Basic Res Cardiol 108(4): 358.

3.4.3. Mechanismen erhöhter mitochondrialer ROS-Produktion bei Herzinsuffizienz

Wie bereits erläutert, entstehen während der oxidativen Phosphorylierung an der Atmungskette bereits unter physiologischen Bedingungen Superoxidanionen (O_2^-).⁵² Nach Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 durch die Superoxid Dismutase (Mn-SOD) erfolgt die Elimination von H_2O_2 durch die Glutathion Peroxidase (GPX) und Peroxiredoxin (PRX; **Abb. 1**). Beide Enzyme benötigen NADPH als Elektronenlieferant, dessen Regeneration von Substraten des Citratzyklus abhängt (**Abb. 1**).^{95, 118} Schlüsselenzyme des Citratzyklus (α -Ketoglutarat- und Isocitrat-Dehydrogenase) sowie die Pyruvat-Dehydrogenase werden durch Ca^{2+} aktiviert, weshalb während physiologischer Arbeitslasterrhöhung durch mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme die ATP-Versorgung an den –Verbrauch angepasst, aber auch die antioxidative Kapazität der mitochondrialen Matrix regeneriert wird.^{61, 64, 70}

3.4.4. Einfluss von $[\text{Na}^+]_i$ auf mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und ROS-Produktion

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden Mechanismen untersucht, durch die Defekte der elektromechanischen Kopplung, wie sie bei Herzinsuffizienz auftreten, ein energetisches Defizit und oxidativen Stress verursachen können (**Abb. 1**). Ein zentrales Defizit in insuffizienten Myozyten ist eine verminderte Ca^{2+} -Beladung des SR, welche auf eine reduzierte Expression und Aktivität der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) sowie eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors zurückzuführen ist^{45, 49, 66}. Darüber hinaus ist die cytosolische Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$) erhöht. In gesunden menschlichen Myozyten beträgt $[\text{Na}^+]_i$ 8 mM und ist in insuffizienten Myozyten auf 12 mM erhöht⁹¹. Eine ähnlich erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ wurde auch in Tiermodellen der kardialen Hypertrophie^{90, 92} und Insuffizienz^{10, 30, 90} beobachtet. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind noch unvollständig geklärt, doch wird insbesondere ein vermehrter später Einstrom über den Na^+ -Kanal (später I_{Na})^{30, 56, 112} und/oder eine erhöhte Expression und Aktivität des

sarkolemmalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) diskutiert¹⁰. Während des Aktionspotenzials ermöglicht die erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ einen verstärkten einwärts gerichteten Ca^{2+} -Transport über den rückwärts gerichteten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX) Strom (revI_{NCX}), was die reduzierte SR Ca^{2+} -Beladung und somit die verminderten Ca^{2+} -Transienten und die eingeschränkte Kontraktilität in insuffizientem Myokard teilweise kompensieren kann^{8, 30, 88, 115, 116}.

Allerdings beschleunigt die erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ den Na^+ -abhängigen Export von Ca^{2+} aus Mitochondrien, wodurch die Ca^{2+} -abhängige Stimulation des Citratzyklus während β -adrenerger Stimulation reduziert und so der Redoxstatus von NADH/NAD⁺ oxidiert wird, was ein energetisches Defizit bei Patienten mit Herzinsuffizienz⁸⁰ aggravieren könnte⁷⁰. In weiteren Arbeiten unserer Gruppe konnte beobachtet werden, dass hierdurch auch die Regeneration von NADPH gestört ist, was eine vermehrte mitochondriale Emission von H_2O_2 und somit oxidativen Stress verursacht⁶¹. Darüber hinaus verursacht die erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom über den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) während des Aktionspotenzials, was auf der einen Seite die bei Herzinsuffizienz verringerte Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und die hierdurch verringerte Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Transienten partiell kompensiert¹³. Auf der anderen Seite ist dies aber für die mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme von Nachteil, da diese aufgrund der geringen Ca^{2+} -Affinität des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters (MCU) auf die enge räumlichen Assoziation von Mitochondrien zum SR und die koordinierte Ca^{2+} Freisetzung aus diesem angewiesen ist (sog. mitochondriale Ca^{2+} -Mikrodomäne⁶⁴), was durch eine eher langsame trans-sarkolemmale Ca^{2+} -Aufnahme über den NCX nicht gegeben ist⁶³.

In neueren Arbeiten unserer Gruppe wurde Mitofusin-2 (Mfn2) als ein „Linker-Protein“ identifiziert, welches Mitochondrien an das SR „koppelt“ und somit eine wichtige molekulare Komponente dieser mitochondrialen Ca^{2+} Mikrodomäne darstellt²³. Die genetische Deletion von Mfn-2, aber nicht Mfn-1 verursachte die Oxidation von NAD(P)H während physiologischer Arbeitslast²³ und die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (unpublizierte Daten aus derselben Kooperation), ohne hierbei die (durch Mfn-1 redundant kontrollierte) mitochondriale Fusion zu beeinträchtigen.²³

3.4.5. Mögliche Regulation mitochondrialer ROS-Produktion über ET-1?

ET-1, welches vermehrt in insuffizientem Myokard vorliegt^{68, 89}, induziert durch Aktivierung des NHE⁴³ einen Anstieg der $[Na^+]_i$, was über einen gesteigerten rev/NCX einen positiv inotropen Effekt hervorruft⁷⁴.

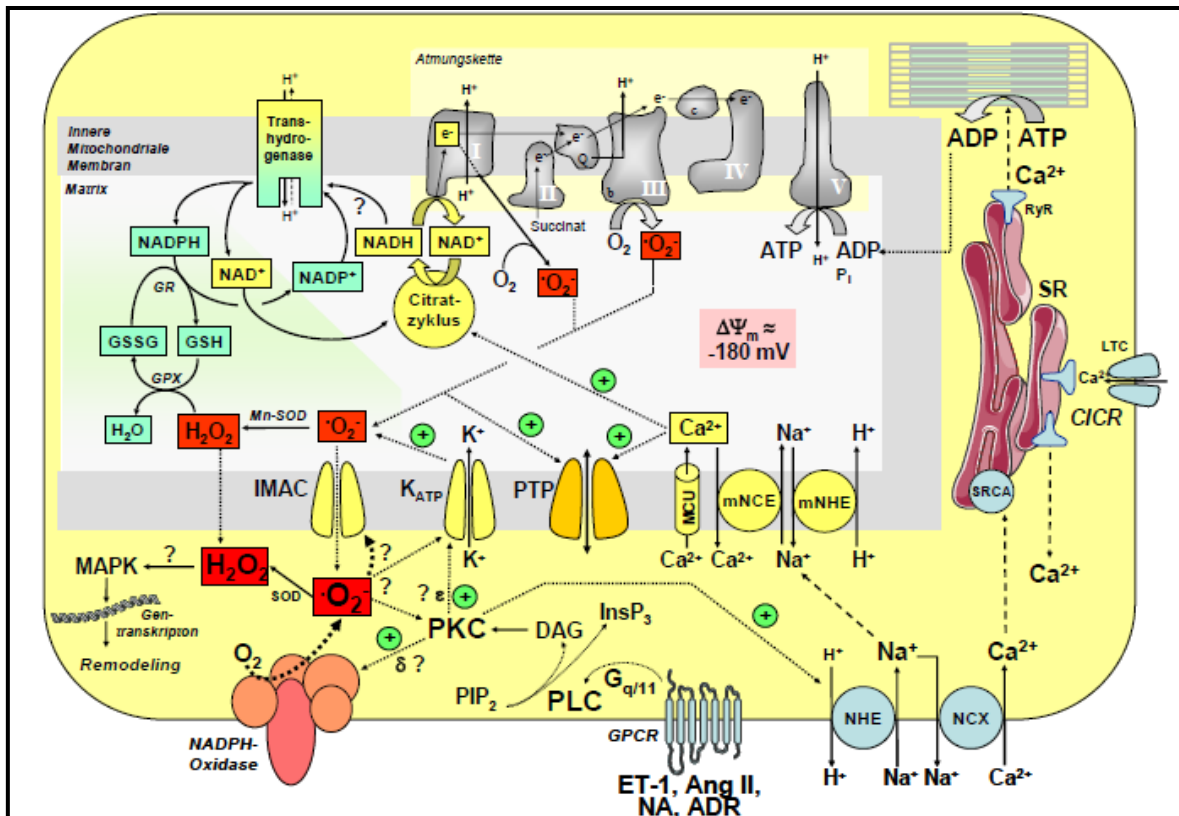


Abbildung 2: Etablierte, postulierte und zu untersuchende Zusammenhänge zwischen elektromechanischer Kopplung, mitochondrialer Energetik, GPCR-Aktivierung, myozytärer ROS-Produktion und MAP-Kinasen Aktivierung. GR, Glutathion-Reduktase; GPX, Glutathion-Peroxidase; IMAC, inner membrane anion channel; MCU, mNCE und mNHE, mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter, $-Na^+/H^+$ -Austauscher und Na^+/Ca^{2+} -Austauscher. NHE, NCX, sarkolemmaler Na^+/H^+ -Austauscher und Na^+/Ca^{2+} -Austauscher. GPCR, G-Protein gekoppelte Rezeptoren; PLC, Phospholipase C; PKC, Protein Kinase C; PIP_2 , Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; DAG, Diacylglycerol; $InsP_3$, Inositol 1,4,5-Trisphosphat; NA, Noradrenalin; ADR, Adrenalin; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; CICR, Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung; SRCA, SR Ca^{2+} -ATPase; LTC, L-Typ Ca^{2+} -Kanal.

Interessanterweise wird ebenfalls der AngII-induzierte positiv inotrope Effekt über einen parakrinen Mechanismus durch ET-1 vermittelt, welches in Myozyten produziert wird^{28, 119}. ET-1 induziert über Aktivierung des NHE und rev/NCX eine kardiale Hypertrophie^{58, 71}, während die Reduktion der $[Na^+]_i$ (durch NHE-Inhibition) das Entstehen einer Herzinsuffizienz vermindert¹¹. Dies legt nahe, dass dem Anstieg der $[Na^+]_i$ eine wichtige pathophysiologische Rolle hinsichtlich des myokardialen Remodelings zukommt. Unklar ist derzeit jedoch, über welchen Mechanismus dies geschieht. Eine Übersicht über die Integration der

mitochondrialen ROS Produktion mitsamt seiner Regulation über Ca^{2+} und Na^{+} mit cytosolischer ROS Produktion an der NADPH Oxidase als Antwort auf Stimulation G-Proten gekoppelter Rezeptoren im Rahmen der neuroendokrinen Aktivierung zeigt **Abb. 2**.

3.5. Ziel dieser Arbeit

Durch die Stimulation von $G_{q/11}$ -gekoppelten (z.B. ET_A -, AT_1 - und α -adrenergen) Rezeptoren wird die Protein-Kinase C (PKC) aktiviert, die sowohl eine NADPH-Oxidase-abhängige als auch eine mitochondriale ROS-Produktion hervorrufen kann. In den meisten Studien wurde die myozytäre ROS-Produktion bisher entweder indirekt oder in ruhenden Zellen bestimmt. Ziel der Arbeit ist es daher, die myozytären ROS-Produktion und ihre hormonelle bzw. molekulare Regulation an isolierten Herzmuskelzellen, in denen durch externe Stimulation die elektromechanische Kopplung abläuft, zu untersuchen. Letzteres ist insofern von Bedeutung, als eine mitochondriale ROS-Produktion durch einen bei myozytärer Arbeit bestehenden Elektronenfluss entlang der Atmungskette begünstigt wird. Darüber hinaus soll die Bedeutung der intrazellulären Na^+ -Konzentration ($[Na^+]_i$) für diese Prozesse untersucht werden, da diese in Myozyten des insuffizienten Herzens erhöht ist, durch GPCR reguliert wird und die mitochondriale Energetik ungünstig beeinflusst. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zu untersuchen:

- 1) inwiefern ROS eine kontraktile und energetische Dysfunktion in Herzmuskelzellen überhaupt induzieren,
- 2) ob die Stimulation von Herzmuskelzellen mit ET-1 zu einer Zunahme der Kontraktilität führt,
- 3) welchen Einfluss ET-1 auf die cytosolische Ca^{2+} und Na^+ Homöostase hat,
- 4) ob ET-1 zu einem Anstieg der ROS Produktion in arbeitenden Myozyten führt.
- 5) Falls ja, wäre interessant, ob diese ROS aus Mitochondrien stammen und auf die Erhöhung von $[Na^+]_i$ zurückzuführen sind, oder ob sie eher von der NADPH Oxidase produziert werden.

Die Ergebnisse sollen Schlüsselprozesse in der Regulation der myozytären ROS-Produktion durch neuroendokrine Aktivierung aufklären und Angriffspunkte für therapeutische Interventionen zur Suppression des kardialen Remodelings identifizieren.

Die Experimente, die meiner Dissertation zu Grunde liegen, waren Teil eines größeren Projektes, an welchem auch andere Mitarbeiter der AG Maack beteiligt waren. Um aber die Ergebnisse meiner eigenen Experimente in den richtigen Kontext zu rücken, werden diese zusammen mit den Ergebnissen der anderen Kollegen berichtet, um die logischen Zusammenhänge auch schon im Ergebnis-Teil besser darstellen zu können. Die Ergebnisse anderer Mitarbeiter werden in den Abbildungen entsprechend ausgewiesen. An diesem Projekt waren neben mir beteiligt:

- 1.) Frau Dr. Tanja Zeller (TZ)
- 2.) Frau Dr. Monika Dudenhöfer (MD)
- 3.) Herr Dr. Andreas Knopp (AK)

4. Materialien und Methoden

4.1. Verwendete Lösungen und Stoffe

Grundlösung (Normaltyrode):

NaCl 130 mmol/l, KCl 5 mmol/l, $MgCl_2$ 1 mmol/l, Na-HEPES 10 mmol/l, Glukose 10 mmol/l, Na-Pyruvat 2 mmol/l, Ascorbinsäure 0,3 mmol/l, EGTA 50 mmol/l.

pH-Wert: 7,4 (Korrektur mit NaOH oder HCl)

Für die Messungen schrittweise Zugabe von $CaCl_2$ 1,25 mmol/l

Isolutionslösung:

NaCl 130 mmol/l, KCl 5 mmol/l, $MgCl_2$ 1 mmol/l, Na-HEPES 10 mmol/l, Glukose 10 mmol/l, Na-Pyruvat 2 mmol/l, Ascorbinsäure 0,3 mmol/l, Collagenase 18 mg/40 ml, Protease 4,3 mg/40 ml.

pH-Wert: 7,4 (Korrektur mit NaOH oder HCl)

High- K^+ -Lösung:

K-Glutamat 120 mmol/l, KCl 25 mmol/l, $MgCl_2$ 1 mmol/l, Na-HEPES 10 mmol/l, Glukose 10 mmol/l, Na-Pyruvat 2 mmol/l, Ascorbinsäure 0,3 mmol/l.

pH-Wert: 7,4 (Korrektur mit KOH oder HCl)

Isoprenalin

Isoprenalin (ISO, $C_{11}H_{17}NO_3$, Fa. Sigam Aldrich) ist ein synthetisch hergestelltes Sympathomimetikum, welches ein Racemat-Derivat des Noradrenalins ist. Es aktiviert selektiv β -Adrenorezeptoren, im Gegensatz zu Noradrenalin, welches vorrangig α -Rezeptoren aktiviert. Isoprenalin bewirkt durch Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches wiederum die Proteinkinase A aktiviert und eine Phosphorylierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen bewirkt. Dies führt zu einer Steigerung des Calciumeinstroms während der Depolarisationsphase, zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration und damit zu einer Kontraktilitätssteigerung^{7, 97, 98}.

Endothelin-1 und Angiotensin II

Endothelin-1 (ET-1) gehört zu den körpereigenen vasoaktiven Substanzen und fungiert als hochwirksamer Vasokonstriktor bei der Regulierung des Blutdruckes. Seine gefäßverengende Wirkung wird etwa hundertmal höher als die von z.B. Noradrenalin geschätzt. Insbesondere bei Patienten mit Herzinsuffizienz werden erhöhte Endothelinspiegel messen^{12, 28}.

Angiotensin II (Ang II) ist ein körpereigenes Peptidhormon, welches eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulierung und Koordination des Wasserhaushaltes im Rahmen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einnimmt^{33, 86}.

Die beiden Hormone vermitteln ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wobei aktuell geklärt werden soll, ob eine dadurch aktivierte Isoform der PKC eine Rolle bei der NADPH-Oxidase-vermittelten ROS-Produktion einnimmt.

Lucigenin

Lucigenin ($C_{28}H_{22}N_4O_6$, Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc.) ist ein chemischer Leuchtstoff, welcher dazu benutzt wird, endogen gebildete Superoxid-Radikale nachzuweisen. Durch chemische Reaktion des Lucigenin mit dem Superoxid-Anion entsteht ein Lucigenin-Salz, welches eine verstärkte Leuchtkraft besitzt und dessen Leuchten gemessen werden kann und mit der Menge der gebildeten Sauerstoffradikale korreliert. Weiterhin besitzt es die Eigenschaft, die Reduktion von Cytochrom C durch die Xanthinoxidase zu medieren sowie die Funktion der NADPH-Oxidase zu erhöhen⁹⁹.

Apocynin

Apocynin ($C_9H_{10}O_3$, Fa. Sigma Aldrich) ist eine chemisch-organische Substanz, welche sich von Acetophenon ableitet und zur Familie der Vanilline zählt. Es fungiert als selektiver Inhibitor der NADPH-Oxidase ohne Beeinflussung anderer in der Zelle befindlicher Strukturen¹⁰⁰.

Diphenyleniodinium (DPI)

Diphenyleniodinium (DPI, $C_{12}H_8Cl$, Fa. Sigma Aldrich) ist ebenfalls ein Inhibitor der NADPH-Oxidase. Es besitzt die Eigenschaft, die NO-Synthetase in

Macrophagen zu hemmen¹⁰². Als Inhibitor von Flavoproteinen inhibiert DPI auch die Komplexe der Atmungskette.

Chelerythrine

Chelerythrine (CHE, $C_{21}H_{18}NO_4$) ist ein pflanzliches Alkaloid des Schöllkrautes (*Chelidonium majus*). Es wirkt als sehr potenter und selektiver Inhibitor der Proteinkinase C. Dabei hemmt es die Translokation der PKC aus dem Zytosol an die Zellmembran¹⁰¹.

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, $C_{36}H_{56}O_8$) ist ein Stoff aus der Gruppe der Phorbolester. Es besitzt eine große strukturelle Ähnlichkeit mit dem körpereigenen PKC-Aktivator Diacylglycerol (DAG) und wirkt als dessen Analogon ebenfalls aktivierend auf die Proteinkinase C¹⁰⁵.

4.2. Isolation von Herzmuskelzellen aus Meerschweinchen-Herzen

Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) wurden durch enzymatische Isolation aus Meerschweinchen Herzen isoliert. Hierzu wurden Meerschweinchen zunächst mit Pentobarbital (~70 mg, je nach Größe des Tieres) in Narkose versetzt siehe **Abb. 3**). Sobald auf leichten und dann stärkeren Schmerzreiz keine Reaktion mehr erfolgte, wurde mit der Präparation begonnen.

Das Meerschweinchen wurde vom Unterbauch aufwärts aufgeschnitten. Nach Durchtrennung des Zwerchfells und des Sternums konnte man das noch schlagende Herz des Meerschweinchens sehen (**Abb. 4**).



Abbildung 3: Narkose des Meerschweinchens

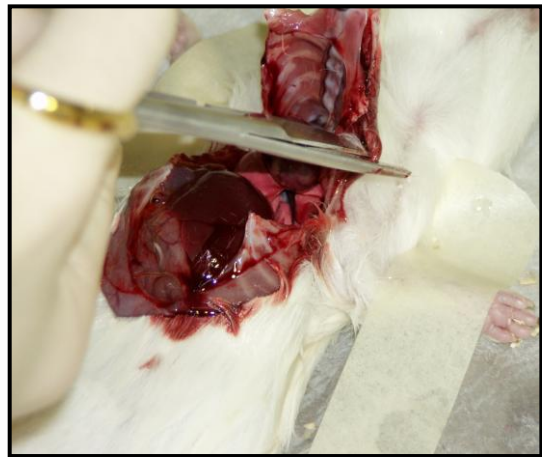


Abbildung 4: Präparation des Meerschweinchens

Dieses wurde mitsamt Aorta herausgetrennt und sofort in eisgekühlte Normal-Tyrodellösung überführt (**Abb. 5**). Hier erfolgten zunächst die Entfernung von versehentlich mit herausgetrennten Lungenanteilen, Bindegewebe sowie die Abpräparation des Perikards. Danach wurde das Herz an die Perfusions-/Isolationsanlage („Langendorff-Perfusionsanlage“, **Abb. 6**) angebracht.

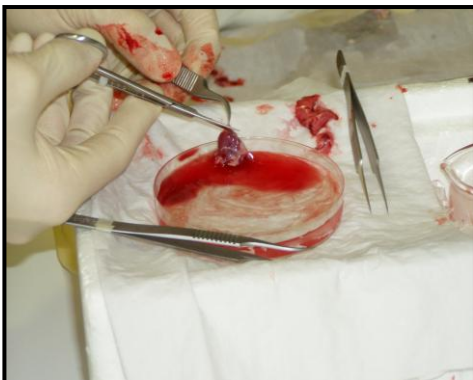


Abbildung 5: Überführung des Herzens in Normaltyrode

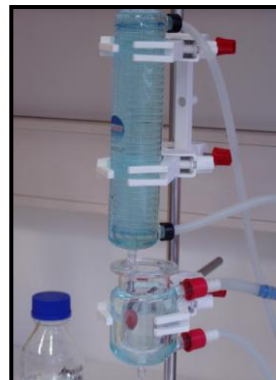


Abbildung 6: Langendorff-Perfusionsanlage

Hierfür wurde die Aorta über die Perfusionskanüle, über welche dann die Isolationslösungen flossen, geschoben und festgebunden (**Abb. 7**).

Hiernach erfolgte die retrograde Perfusion der Aorta, was die Perfusion des Herzens über die Koronararterien ermöglichte. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 8,4 ml/min. Dabei wurde das Herz mit einem erwärmten Wasserbadgefäß umgeben und so auf 37 °C gehalten (**Abb. 8**), die Perfusionslösungen wurden ebenfalls auf 37 °C erwärmt. Die Perfusion erfolgte zunächst drei Minuten lang mit oxygenierter Normal-Tyrodelösung, danach sechs Minuten lang mit oxygenierter Kollagenase-Lösung. Dabei wurde genau verfolgt, ab wann die herabtropfende Flüssigkeit aus dem Herzen beginnt, immer längere Tropfen zu ziehen, was den Beginn der enzymatischen Verdauung von Collagen durch Collagenase anzeigt. Von da an wurde das Herz weitere zwei Minuten mit der Kollagenase-Lösung perfundiert. Anschließend erfolgte sieben Minuten lang die Perfusion mit oxygenierter, hyperkaliämischer Lösung (High-K⁺-Lösung). Danach wurden die Ventrikel von den Vorhöfen auf Klappenebene mit einer Schere abgetrennt und in eine mit hyperkaliämischer Lösung gefüllte Petrischale gelegt.

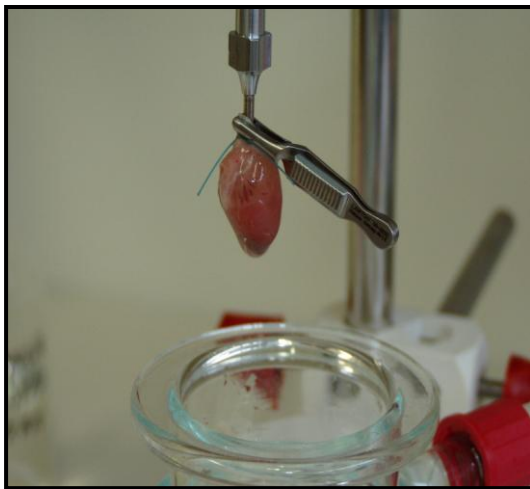


Abbildung 7: Befestigung an der Anlage

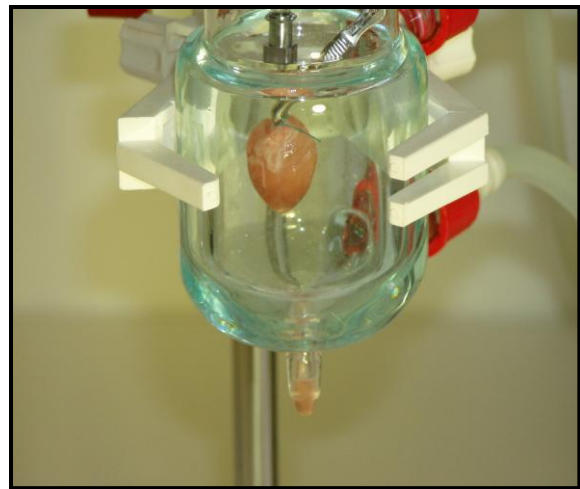


Abbildung 8: Erwärmt Wasserbad

Das Ventrikulgewebe wurde mit einer Schere in etwa 1 mm³ große Stücke geschnitten und die Gewebestücke mittels einer Pipette vorsichtig resuspendiert, um die Myozyten aus dem Zellverband zu lösen (**Abb. 9**). Danach wurde die Suspension über einen vorher in Ethanol getränkten und anschließend getrockneten Filter gegeben, um grobe Gewebestücke zu entfernen. Die gefilterte Flüssigkeit wurde etwa fünfzehn Minuten stehen gelassen, damit sich die isolierten

Myozyten absetzen konnten. Der Überstand wurde danach entfernt und die Zellen mit DMEM-Medium versetzt. Es erfolgte die Lagerung bei 37 °C für eine Stunde im Medium. Danach wurde das Medium wieder abpipettiert und die Zellen in calciumhaltige Normal-Tyrodelösung überführt. So wurden die Myozyten (**Abb. 10**) bis zum Beginn der Versuche bei 37 °C gelagert.

Die Isolation der Meerschweinchenkardiomyozyten war um so erfolgreicher, die Ausbeute um so besser und die Zellen waren umso stabiler, je optimaler es gelang, das noch schlagende Herz des Tieres möglichst schnell gekühlt vom Perikard zu befreien und so schnell wie möglich an der Anlage anzubringen und mit der Isolation zu starten.

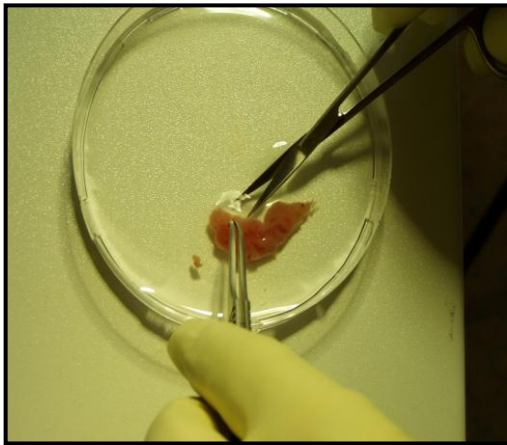


Abbildung 9: Zerkleinerung des Myokards

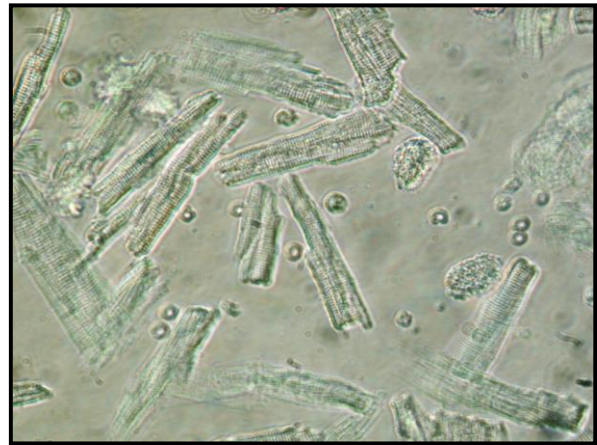


Abbildung 10: Isolierte ventrikuläre Myozyten

4.3. Bestimmung der Zellverkürzung in isolierten Herzmuskelzellen

Die Bestimmung der Zellverkürzung und der anderen ergänzenden Parameter erfolgte mit einem speziellen Mess-System (Complete Single Cell Investigation System, Fa. Scientific Instruments GmbH, Heidelberg, **Abb. 11**).

Während der Messung lagen die isolierten Zellen in einer Stimulationskammer unter dem Mikroskop. Es konnte jeweils nur eine einzelne Zelle während des Messvorganges aufgenommen werden, so dass die am besten kontrahierende Zelle ausgewählt und möglichst horizontal im Mikroskop eingestellt wurde, um so von der Zeilenkamera besser erfasst werden zu können. Bei 100-facher Vergrößerung erfolgte dann die Messung. Dabei wurde die Zelle von zwei Kameras erfasst. Die erste Kamera gab nochmals das Mikroskopbild vergrößert auf einem Monitor wieder, die zweite Kamera war eine so genannte Zeilenkamera, welche die Enden des Myozyten und damit die Länge und Längenveränderung während der Kontraktion erfasste. Die Erfassung der Zellenden erfolgte dabei über die Erkennung von Helligkeitsunterschieden in der Kammer, dabei konnte die Kamera v.a. Helligkeitsunterschiede in horizontaler Ebene besonders gut erfassen, weshalb es wie anfangs schon genannt wichtig war, dass die zu messende Zelle möglichst horizontal im Mikroskop eingestellt wurde (**Abb.12**).

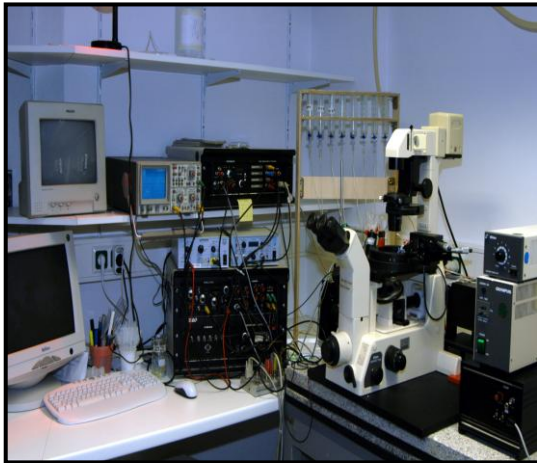


Abbildung 11: Mess-System Complete Single Cell Investigation System

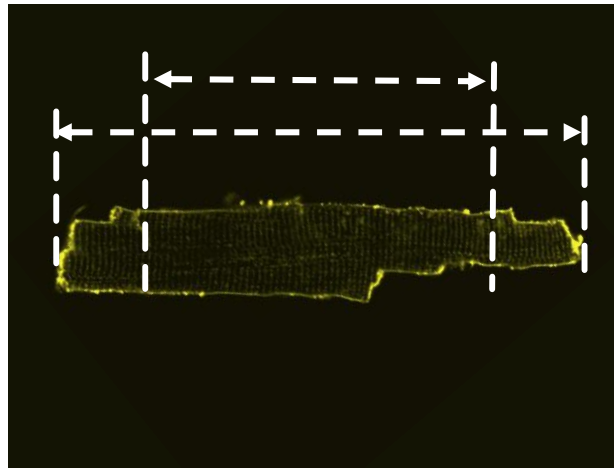


Abbildung 12: Zellerfassung der Zeilenkamera

Das aufgenommene Bild der Kamera wurde auf einem Oszillographen dargestellt, bei welchem die Ablenkzeit auf dem Horizontalverstärker mit 5 V/div eingestellt wurde. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein

stehendes Bild erhielt. Wurde nun durch die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrgenommen, so wurden diese auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Auslenkung dargestellt. Diejenigen Amplituden, welche die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden und waren jeweils auch meist die höchsten Amplituden. Hierdurch war es nun möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten. Schematische Darstellung des Ausschlages der Zelllänge im Oszillographen siehe **Abb. 13**.

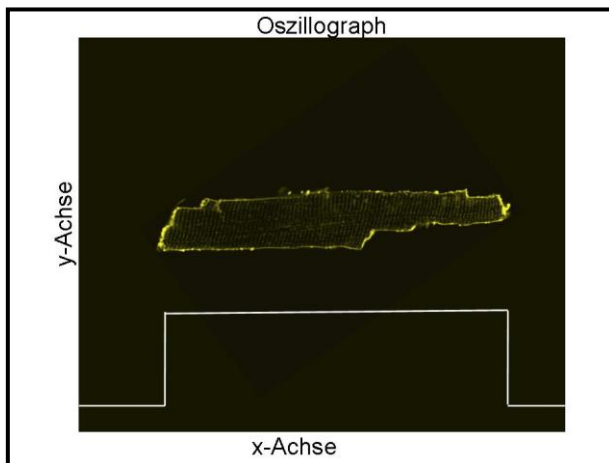


Abbildung 13: Anzeige der Zelllänge im Oszillographen

Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanal-Oszillograph betrieben. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert, indem man eine Triggermarke des Interface setzte, die ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor einer Amplitude des Zellbildes. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar durch die Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph, die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben

sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog. Wurde die Spannung ein- bzw. ausgeschaltet, so wurde diese Information über den Oszillographen an das Interface und von da an den Computer weitergeleitet. Die gemessenen Daten wurden auf dem Rechner mit einem speziell entwickelten Software Programm (Mucell; Scientific Instruments GmbH, Heidelberg, Deutschland) registriert und weiter verarbeitet. Über die Verarbeitung der verschiedenen Spannungsimpulse sowie Helligkeitsänderungen und Darstellung im Oszillographen erstellte das Programm aus all diesen Informationen die Länge der Zelle absolut sowie deren Veränderung im Verlauf der Kontraktion und stellte diese Informationen in einem Graphen dar. In diesem graphischen Abbild konnte man die Länge des Myozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt sehen, sowie einen Verlaufsgraphen mit den jeweiligen Kontraktionsstärken in Abhängigkeit von der Zeit. Das Programm erkannte dabei durch die Übermittlung der Information „Spannung ein-Impuls gesendet“ an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Dabei wurden jeweils folgende Werte aufgezeichnet:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit vom Kontraktionsbeginn bis zur maximalen Kontraktion („Time-to-Peak“) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (Bestimmung aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde
6. Die Zeit von der 10 %-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden („T10-to-Peak“)
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90 % der Zellverkürzungsstrecke („R90-Wert“)

Aus diesen Parametern berechnete das Programm dann weitere drei ergänzende Parameter:

1. Der Quotient $\Delta L/L$: Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge (ΔL). In Prozent ausgedrückt zeigt die $\Delta L/L$ an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Conmax als Ratenkonstante für maximale Kontraktionsgeschwindigkeit:
Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Zellverkürzung bestimmt und in $\mu\text{m/s}$ angegeben.
3. Die Relmax als Ratenkonstante für die maximale
Relaxationsgeschwindigkeit wird als erste zeitliche Ableitung der Relaxation bestimmt und in $\mu\text{m/s}$ angegeben.

4.4. Bestimmung von intrazellulären Ionenverhältnissen und Membranspannungen mittels Fluoreszenz-Imaging und Patch-Clamp-Technik

4.4.1. Die Patch-Clamp-/Fluoreszenz-Imaging-Anlage und das -Verfahren

Alle in unseren Experimenten benutzten Farbstoffe bis auf FURA-2 wurden an einer Patch-Clamp- und Fluoreszenz-Imaging-Anlage gemessen. Diese besteht aus einem kombinierten Messplatz aus Patch-Clamp- und Fluoreszenz-Setup mit einem inversen Mikroskop (NIKON Eclipse TE 2000-U; Nikon Instruments Europe B.V.), welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC SyS 63-560; Technical Manufacturing Corporatia USA) unter einem selbstgebauten Faraday'schem Käfig steht. Eine Abbildung unserer Anlage ist in **Abb. 14** zu sehen.



Abbildung 14: Patch-Clamp-Arbeitsplatz

Die Patch-Clamp-Einheit besteht aus einem HEKA EPC 10 und wurde mit der Software PatchMaster (V2.11) der Firma HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH betrieben. Durch diese Software wurden auch direkt das Filterrad und der Shutter betrieben sowie indirekt über den EPC 10 auch der Stimulator (SIU-102; Warner Instruments, LLC USA). Durch den PatchMaster wurden weiterhin auch die Daten der Photoelektronen-Vervielfacher (engl. photomultiplier tube, PMT) aufgezeichnet. Die Fluoreszenz-Einheit an sich besteht weiterhin aus einer Anregungseinheit (EXFO X-Cite Series 120; Lumen Dynamics Group Inc. Canada) mit einer 120 Watt „High Pressure Metal Halide ARC“-Lampe (X-Cite®120LAMP; Lumen Dynamics Group Inc. Canada), einem Filterrad mit

verschiedenen Filtern (diese sind in **Abb. 16** als Tabelle genauer aufgeführt) zum schnellen Wechsel zwischen zwei Anregungswellenlängen (LAMBDA 10B / SMART SHUTTER; Sutter Instruments USA) und drei PMTs (PTI Model 814; Photon Technology International Canada), denen verschiedene austauschbare Filter und Strahlenteiler vorgeschaltet sind (siehe **Abb. 16**) Eine schematische Skizze des Setups ist in **Abb. 15** dargestellt.

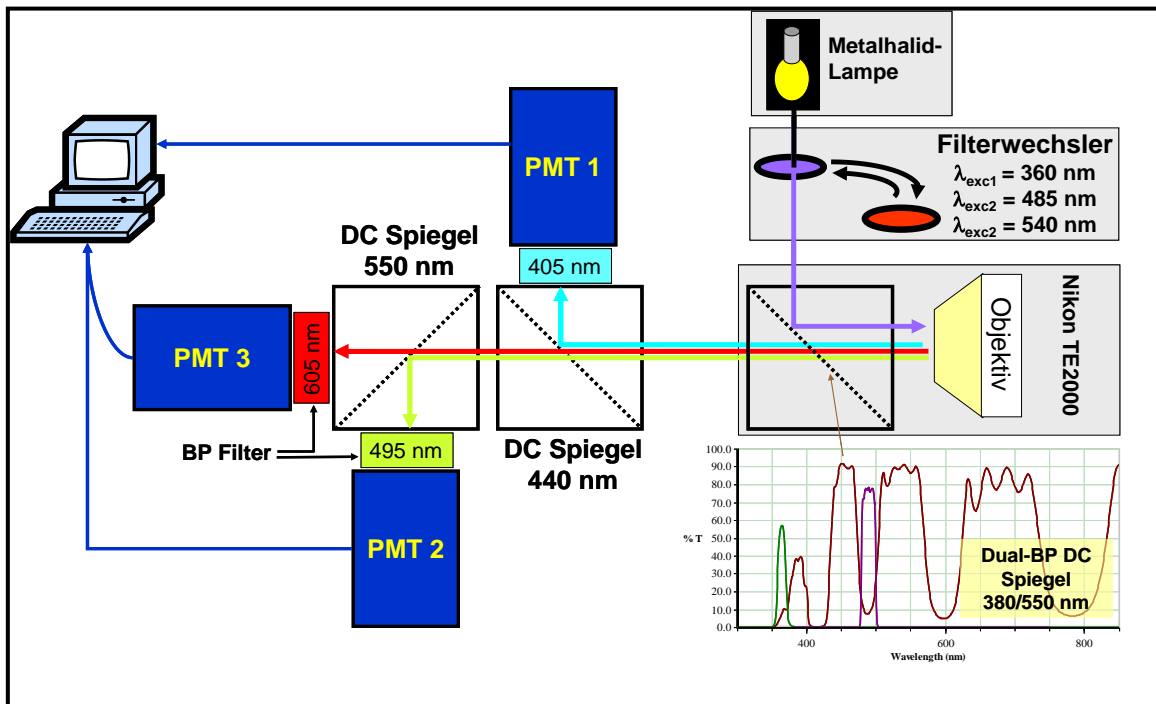


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Imaging-Anlage. Anordnung von Lichtquelle, Filterwechsler, dichroischen (DC) Spiegeln, Bandpass (BP) Filtern und Photomultiplier Röhren (PMT).

Weiterhin bestand bei unseren Experimenten die Möglichkeit, über die Versuchskammer (RC27NE), über eine beheizbare Plattform (PH-1) und über eine Durchfluss-Heizung (SHM6 221 1301) eine bestimmte Temperatur während den Experimenten aufrecht zu erhalten.

Die Steuerung der Temperatur erfolgte durch einen „Dual Automatic Temperatur Controller“ (TC-344B). Alle Geräte für die Temperaturregulierung als auch die Versuchskammer wurden von der Firma Warner Instruments, LLC USA bezogen. Die Versuchskammer an sich wurde für die Experimente nach unten hin durch ein mit Silikon abgedichtetes Deckgläschen begrenzt und beinhaltet Platinstimulationselektroden. Für die Experimente wurden die jeweiligen Deckgläschen mit Laminin (Roche, 11243217001) beschichtet, bevor die

Myozyten appliziert wurden, um ein „Wegschwimmen“ der Zellen bedingt durch den Flussstrom der durchfließenden Experiment-Lösungen zu vermeiden.

Spiegel	Filterset	Farbstoffe	Ort
D365/10x	1 & 2	NADH / Indo 1	Im Filterrad (Position 2)
D490/20x	2	DCF / Fluo 4	Im Filterrad (Position 3)
D540/25x	1	TMRM / Rhod 2	Im Filterrad (Position 1)
390/560/1064 pc	1	Indo 1 / Rhod 2 od. TMRM	Im Mikroskop (Filter 1) unterm
51000bs	2	NADH / Fluo 4 oder DCF	Im Mikroskop (Filter 2) unterm
440dcxr	1	Indo 1 / Rhod 2 od. TMRM	Im Strahlenteiler Würfel vor
490dcxru	2	NADH / Fluo 4 oder DCF	Im Strahlenteiler Würfel vor
565dcxr	1	Indo 1 / Rhod 2 od. TMRM	Im Strahlenteiler Würfel zw.
Reiner Spiegel	2	NADH / Fluo 4 oder DCF	Im Strahlenteiler Würfel vor
D405/30m	1	Indo 1	Vorm PMT1
D455/35m	2	NADH	Vorm PMT1
D485/25m	1	Indo 1	Vorm PMT2
D525/30m	2	Fluo 4 / DCF	Vorm PMT2
D605/55m	1	Rhod 2 / TMRM	Vorm PMT3

Abbildung 16: Tabelle mit der Darstellung der verschiedenen genutzten Filter. Filterset 1 wurde für die Messung von Indo 1, Rhod 2 sowie TMRM benutzt. Filterset 2 wurde für die Messung von NAD(P)H, Fluo4 oder DCF benötigt. Die Filter und Spiegel sind jeweils austauschbar und wurden entsprechend dem durchgeführten Experiment jeweils ausgetauscht. Alle Filter und Spiegel wurden von der Firma ChromaTechnology Corp, USA bezogen

Die statistische Analyse der Daten sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte entweder über Microsoft Office Excel oder mittels der Software GraphPadPrism (GraphPad Software, Inc.).

4.4.2. Fluoreszenz-Farbstoffe

Bei Farbstoffen wird zwischen ratiometrischen und nicht ratiometrischen Farbstoffen unterschieden. Ratiometrischen Farbstoffe besitzen entweder zwei Anregungswellenlängen (λ_{Exc}) und eine Emissionswellenlänge (λ_{Em}) wie z.B. Fura2 oder umgekehrt eine Anregungswellenlänge und zwei Emissionswellenlängen wie z.B. Indo 1. In den meisten Fällen intensiviert sich bei einer der beiden Wellenlängen das Fluoreszenzsignal bei der Bindung des Liganden und schwächt sich dementsprechend bei der zweiten Wellenlänge ab, teilweise kann das Signal aber auch konstant bleiben. Das Verhältnis (Ratio) der beiden Wellenlängen ist unabhängig von der Intensität der beiden Wellenlängen

(da sich diese mathematisch herauskürzt und damit relativiert) und ist somit unabhängig von der Größe des gemessenen Objektes und dessen Beladung mit dem Farbstoff. Daher ist die Ratio ein direktes Maß für die Konzentration des Liganden. Die nicht ratiometrischen Farbstoffe teilen sich nochmals auf in welche die durch Bindung des Liganden eine reversible (z.B. Fluo 4 & Rhod 2) oder eine irreversible Intensitätsänderungen (z.B. DCF) zeigen. Nicht ratiometrische Farbstoffe haben nur eine Anregungs- und eine Emissionswellenlänge und werden deshalb als „Pseudo-Ratio“ (F/F_0) dargestellt, wobei die gemessene Fluoreszenz (F) zu einem beliebigen Zeitpunkt des Experimentes auf den Fluoreszenzwert zu Beginn des Experimentes (F_0) bezogen wird. Bedingt durch diese Eigenschaft können nicht ratiometrische Farbstoffe nur Änderungen der Konzentration des Liganden innerhalb des Experiments aufzeigen, lassen aber keine Rückschlüsse auf Konzentration des Liganden vor Beginn des Experimentes zu.

In unseren Experimenten wurden folgenden Fluoreszenzfarbstoffe (**Abb. 17** zeigt eine genaue Übersicht über Hersteller und Bestellnummer) verwendet:

- Für $[Ca^{2+}]_c$: Indo-1 Salz ($\lambda_{Exc} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 405/495 \text{ nm}$) als zellimpermeabler Farbstoff zur intrazellulären Applikation über die Patch-Pipette oder als Indo 1 AM bzw. Fura 2 AM ($\lambda_{Exc} = 340/380 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 510 \text{ nm}$) als zellpermeabler Indikator. Beide Farbstoffe erlauben die ratiometrische Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$, welche durch Kalibration quantifiziert werden kann. Fluo 4 AM ($\lambda_{Exc} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$) ist ein zellpermeabler Indikator.
- Für $[Ca^{2+}]_m$: Rhod 2 AM ($\lambda_{Exc} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 605 \text{ nm}$) zellpermeabler Indikator.
- Für H_2O_2 : DCF ($\lambda_{Exc} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 525 \text{ nm}$) zellpermeabler Indikator.
- Für $\Delta\Psi_m$: TMRM ($\lambda_{Exc} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 605 \text{ nm}$) zellpermeabler Indikator.
- Für **NADH**: Autofluoreszenz ($\lambda_{Exc} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$). Die Quantifizierung erfolgt durch Applikation von FCCP und Cyanid am Ende eines jeden Experimentes. Durch FCCP kommt es zur vollständigen

Oxidation, durch Cyanid zur Reduktion von NADH, so dass der Anteil des reduzierten NADH berechnet werden kann.

Farbstoff	Ligand	Bezeichnung / Bestellnummer / Firma
TMRM	$\Delta\Psi_m$	Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate / T-668 / Molecular Probes®; Life Technologies
Fluo 4 AM	Ca^{2+}	Fluo-4, AM, cell permeant / F14201 / Molecular Probes®; Life Technologies
Fura 2 AM	Ca^{2+}	Fura-2, AM, cell permeant / F1221 / Molecular Probes®; Life Technologies
Indo 1 AM	Ca^{2+}	Indo - 1, AM, cell permeant / 84008 / AnaSpec, EGT Corporate
Indo 1 salt	Ca^{2+}	Indo - 1, pentapotassium salt / 84000 / AnaSpec, EGT Corporate
DCF	H_2O_2	CM-H2DCFDA / C6827 / Molecular Probes®; Life Technologies
Rhod 2 AM	Ca^{2+}	Rhod-2 AM *UltraPure Grade*, cell permeant / 21064 / AAT Bioquest®

Abbildung 17: Tabelle mit der Darstellung der verschiedenen genutzten Filter. Filterset 1 wurde für die Messung von Indo 1, Rhod 2 sowie TMRM benutzt. Filterset 2 wurde für die Messung von NAD(P)H, Fluo4 oder DCF benötigt. Die Filter und Spiegel

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden entweder durch Präinkubation oder mit Hilfe der Patch-Clamp Technik über die Patch-Pipette in die Zelle direkt eingebracht.

Abb. 18 zeigt eine schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik.

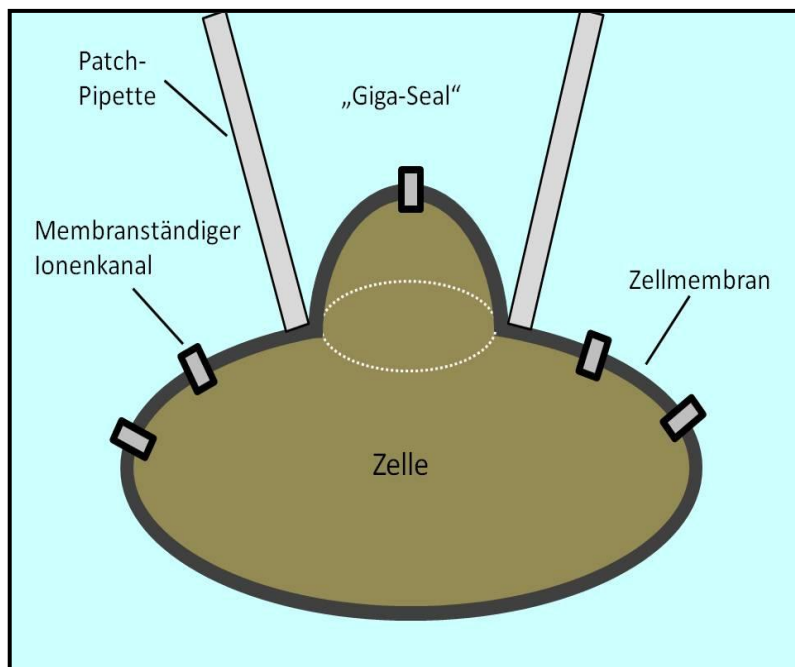


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Patch-Clamp- Methode

Präinkubation:

- Indo-1 AM / Fura2 AM / Fluo4 AM: 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen in Medium, anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Normaltyrode überführt
- Rhod2 AM: Eine Stunde bei 37°C im Dunklen, anschließend Mediumwechsel zum Entfernen des nicht aufgenommen Farbstoffes und erneute Lagerung für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln.
- DCF: Die Zellen wurden in Normaltyrode überführt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die erneute Überführung in Normaltyrode
- TMRM: Überführung der Zellen in Normaltyrode und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend Überführung in frische Normaltyrode.

5. Ergebnisse

5.1. Effekte exogener ROS auf die elektromechanische Kopplung in Herzmuskelzellen

Es ist bekannt, dass ROS zu einer kontraktile Dysfunktion führen können. Viele dieser Experimente, insbesondere auch Arbeiten unserer eigenen Gruppe⁷¹, wurden an isolierten Herzmuskeltrabekeln durchgeführt. An diesen kann aber nur die Kontraktilität aufgezeichnet werden. Um jedoch Aufschluss über die zellulären Defekte zu erlangen, die durch eine akute ROS-Freisetzung ausgelöst werden können, haben wir zunächst den Einfluss von ROS auf die elektromechanische Kopplung, aber auch die mitochondriale Energetik, an isolierten Meerschweinchen Kardiomyozyten näher untersucht.

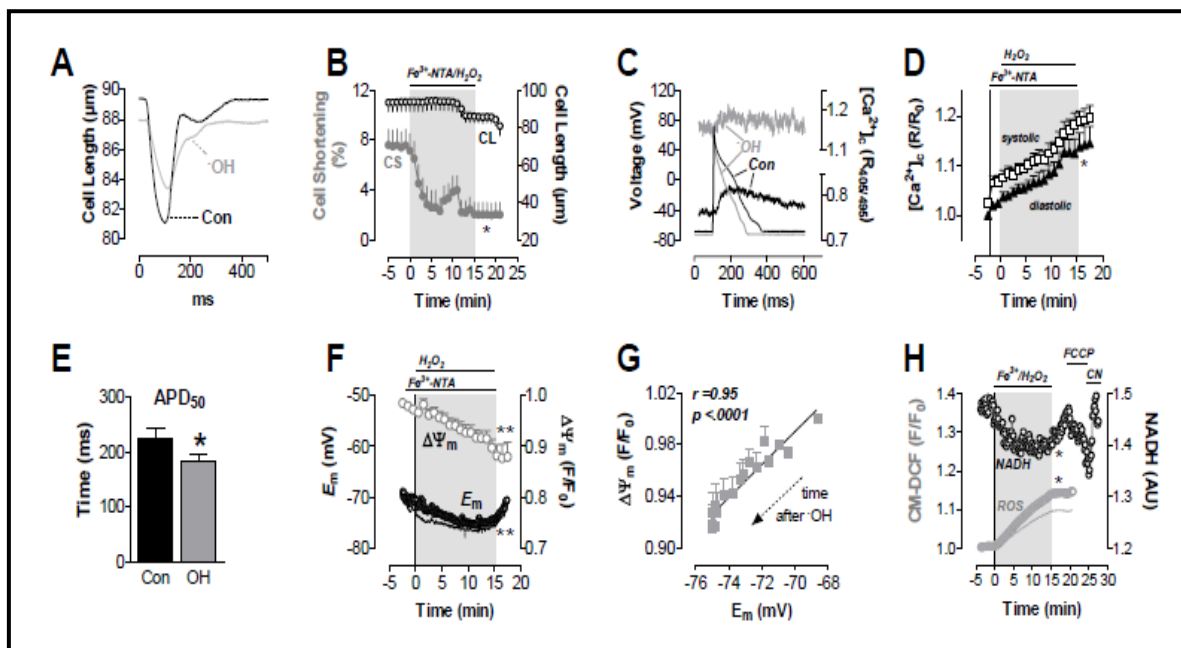


Abbildung 19: Effekte von $\cdot\text{OH}$ (Fe^{3+} -NTA, 0,1 mmol/l; H_2O_2 , 1 mmol/l) in Meerschweinchen-Kardiomyozyten. **A** und **B:** Effekte von $\cdot\text{OH}$ auf die Zellverkürzung im Zeitverlauf (**B**) und nach 15-minütiger Applikation von $\cdot\text{OH}$ (**A**). **C-E:** $\cdot\text{OH}$ -induzierte Veränderungen der AP-Formation (**C**), der Dauer des AP (**E**) nach 15 Minuten sowie der systolischen und diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**C** und **D**). **F:** Effekte von $\cdot\text{OH}$ auf $\Delta\Psi_m$ und E_m . **G:** Korrelation zwischen $\cdot\text{OH}$ -induzierten Veränderungen in $\Delta\Psi_m$ und E_m . **H:** Effekte von $\cdot\text{OH}$ auf NADH und Kardiomyozyten-DCF-Fluoreszenz. Die maximale Oxidation und Reduktion von NADH wurde bei FCCP (5 $\mu\text{mol/l}$) und Na-Zyanid (CN, 4 mmol/l) erreicht. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Kontrollbedingungen (vor $\cdot\text{OH}$). Experimente C-H durchgeführt von Fr. Dr. T. Zeller.

Die kombinierte Applikation von Fe^{3+} -NTA und H_2O_2 produziert Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$). Die Zugabe von $\cdot\text{OH}$ führte zu einer ausgeprägten Verringerung der Zellverkürzungsamplitude über einen Zeitraum von 15 min (**Abb. 19A, B**). Nach Auswaschen der $\cdot\text{OH}$ war dieses kontraktile Defizit nicht reversibel. Die Abnahme

der entwickelten Zellverkürzung war mit einer Abnahme der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Myozyten assoziiert. In den letzten Minuten der $\cdot\text{OH}$ -Exposition kam es zu einer leichten Verkürzung der diastolischen Zelllänge als Zeichen einer diastolischen Dysfunktion (**Abb. 19B**).

Um herauszufinden, welche Mechanismen der systolischen und diastolischen Dysfunktion zugrunde liegen, haben wir Patch-Clamp Experimente durchgeführt, in denen im Current Clamp Modus den Myozyten ermöglicht wurde, durch Injektion eines Stroms das Membranpotenzial zu depolarisieren, was ein zelleigenes Aktionspotenzial der Zelle triggert (Experimente von Frau Dr. Tanja Zeller). Gleichzeitig wurde in das Zytosol der Zellen der Ca^{2+} -Farbstoff Indo-1 eingewaschen, um während der ROS-Applikation die Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) zu messen. Die Kardiomyozyten wurden darüber hinaus vor den Experimenten mit dem Farbstoff TMRM inkubiert, welcher in Mitochondrien akkumuliert und dort das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) wiedergibt. Somit konnte in diesen Zellen das sarkolemmale und mitochondriale Membranpotenzial, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und die Aktionspotenzialdauer gleichzeitig analysiert werden.

Die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wird durch $\cdot\text{OH}$ erhöht und die Amplitude der Calcium-Transienten gegen Ende der 15-minütigen $\cdot\text{OH}$ -Exposition erniedrigt (**Abb. 19C, D**). Die Aktionspotenzialdauer (APD_{50}) wird um $17\pm 6\%$ verkürzt (**Abb. 19E, F**), was assoziiert war mit einer leichten Hyperpolarisation des sarkolemmalen Membranpotentials (E_m) im Rahmen der $\cdot\text{OH}$ -Exposition (**Abb. 19F**). Die Hyperpolarisation von E_m kann mit einer Aktivierung von sarK_{ATP} -Kanälen assoziiert sein, diese wiederum regulieren den Nukleotidpool und sind eng mit der mitochondrialen ATP-Produktion verknüpft. In der Tat kam es während der $\cdot\text{OH}$ -Exposition zu einer langsamen Dissipation des mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), welches die treibende Kraft der ATP-Produktion darstellt. (**Abb. 19F**). Die Dissipation von $\Delta\Psi_m$ korrelierte wiederum mit der Hyperpolarisation des E_m (**Abb. 19G**). $\Delta\Psi_m$ wird durch den Elektronentransport an der Atmungskette (ETC) aufgebaut, welches NADH als Hauptsubstrat benutzt.

Um den Mechanismus der energetischen Depletion durch $\cdot\text{OH}$ besser zu verstehen, exponierten wir quieszente (nicht schlagende) Kardiomyozyten an Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$). Zur Detektion von ROS inkubierten wir die Zellen vorher mit dem H_2O_2 - und $\cdot\text{OH}$ -sensitiven Farbstoff CM-DCF (Emission auf einer Wellenlänge von 525 nm). Mit alternierender Exzitation zwischen 340 nm und 485 nm regten wir hierbei entweder DCF oder die Autofluoreszenz von NAD(P)H an. In der Tat führte die $\cdot\text{OH}$ Applikation zu einem deutlichen Anstieg von CM-DCF und parallel zu einer ausgeprägten Oxidation von NAD(P)H. Nach Auswaschen der $\cdot\text{OH}$ kam es zu einer partiellen Erholung des Redoxstatus von NAD(P)H (**Abb. 19H**).

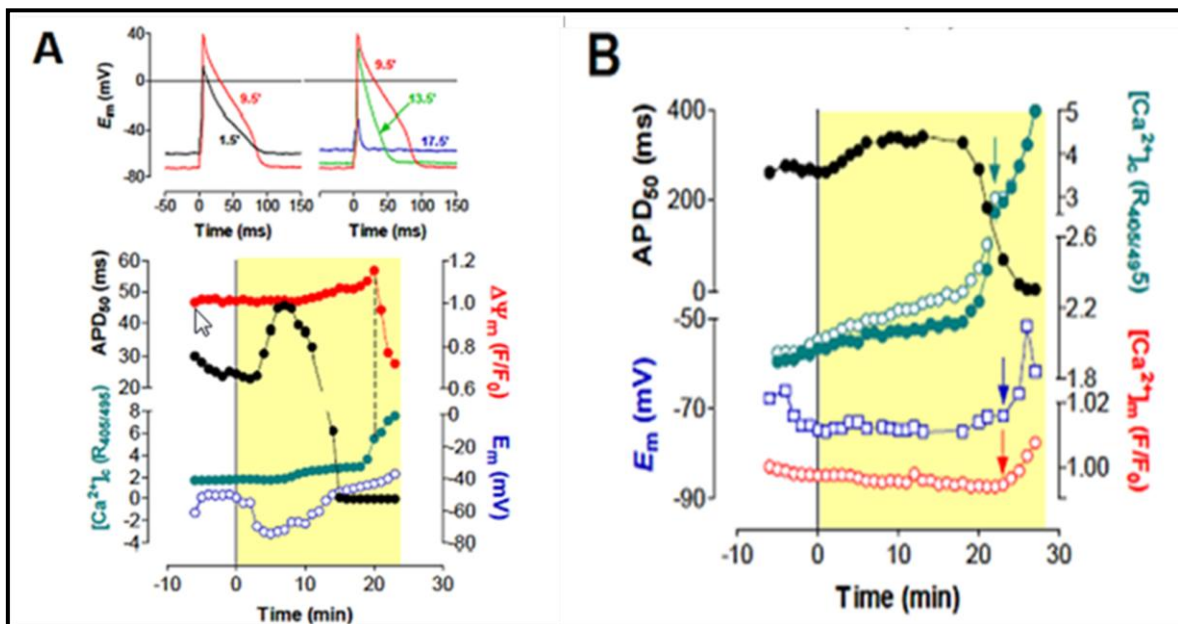


Abbildung 20: Effekte von $\cdot\text{OH}$ (Fe^{3+} -NTA, 0,1 mmol/l; H_2O_2 , 1 mmol/l) für länger als 15 Minuten auf die Parameter der elektromechanischen Kopplung und mitochondrialen Energetik in ventrikulären Meerschweinchen-Kardiomyozyten:
A: Eine Zelle wurde mit TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester) und Indo-1 beladen, um $\Delta\Psi_m$ und $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zusammen mit dem Membranpotential (E_m) und der Aktionspotentialdauer (APD_{50}) darzustellen. Die Zellen wurden in *Current Clamp* Methode mit 1 Hz stimuliert. Zum Zeitpunkt 0 wurde $\cdot\text{OH}$ eingewaschen. Oben dargestellt: Repräsentative Aktionspotentiale zu den angegebenen Zeitpunkten. Unten dargestellt: Zeitverläufe von APD_{50} , diastolischer $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (linke Achse), $\Delta\Psi_m$ und E_m (rechte Achse). Zum Zeitpunkt von Minute 20 kommt es zu einem Calcium-Overload während $\Delta\Psi_m$ noch polarisiert ist (gestrichelte Linie). Kurz nach dem Auftreten des cytosolischen Calcium-Overloads depolarisiert $\Delta\Psi_m$ dann irreversibel. Selbst nach der Dissipation von $\Delta\Psi_m$ ist E_m immer noch teilweise polarisiert und zeigt damit an, dass kein artifizieller Membranschaden entstanden ist, welches die zytosolische Calciumüberladung induziert haben könnte.
B: Die Zellen wurden mit RHOD-2-AM (statt TMRM) beladen, um $[\text{Ca}^{2+}]_m$ und $[\text{Ca}^{2+}]_c$ gleichzeitig zu messen. In diesem Beispiel folgt dem cytosolischen Calcium-Overload das mitochondriale Calcium-Overload (Pfeile). Man beachte, dass zum Zeitpunkt der cytosolischen Calcium-Überladung E_m weiterhin polarisiert ist, was damit eine weiterhin intakte Zelle darstellt. Experimente durchgeführt von Fr. Dr. T. Zeller.

Die meisten Zellen überlebten dieses 15-minütige ROS-Protokoll. Um zu untersuchen, wie sich eine länger anhaltende ROS-Applikation auf die elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik auswirkt, haben wir einzelne Experimente auch über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Bei Verlängerung der Applikationszeit von $\cdot\text{OH}$ auf mehr als 15 Minuten zeigten Zellen

mit einer prominenten cytosolischen Calciumüberladung eine teilweise fulminante Dissipation des $\Delta\Psi_m$ (**Abb. 20A**). Auf die cytosolische Calciumüberladung folgte das mitochondriale Calciumoverload (**Abb. 20B**), welches zusammen mit ROS die Öffnung der MPTP (Mitochondrial permeability transition pore) und Dissipation des $\Delta\Psi_m$ triggern könnte.

5.2. Effekte von ET-1 auf elektromechanische Kopplung, mitochondriale Energetik und ROS-Produktion

Eine charakteristische Veränderung bei chronischer Herzinsuffizienz ist eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]_i$). Unsere eigenen Vorarbeiten zeigen, dass eine erhöhte $[\text{Na}^+]_i$ zur Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus und zu einem Anstieg der zellulären H_2O_2 -Emission führen kann^{62, 70}. Die Mechanismen für einen Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ in Kardiomyozyten sind hierbei nicht vollständig geklärt, doch werden derzeit zwei Mechanismen favorisiert. Hierbei handelt es sich um eine verstärkte Aktivität des (TTX-sensitiven) späten Na^+ -Stroms (I_{Na}) und zum anderen des sarkolemmalen Na^+/H^+ -Austauschers (NHE).^{9, 30, 77, 84, 114} Der späte I_{Na} wird entscheidend durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII) reguliert,¹¹⁴ welche in insuffizientem Myokard verstärkt exprimiert, phosphoryliert und somit aktiviert ist.^{20, 48, 60} Der NHE wird hingegen über die Protein-Kinase C nach Stimulation $\text{G}_{q/11}$ gekoppelter Rezeptoren durch Angiotensin II (Ang II) oder Endothelin-1 (ET-1) aktiviert.^{1, 2, 65, 108} Es wurde beschrieben, dass ET-1 und Ang II durch Stimulation der PKC und des NHE einen Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ herbeiführen, was über Aktivierung des *reverse-mode* NCX einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und der Kontraktilität auslöst.^{1, 2, 24} Da durch Ang II bzw. ET-1 auch eine Stimulation der Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) Produktion durch NADPH-Oxidase und Mitochondrien beschrieben ist,^{15, 24, 59} spekulierten wir, dass zumindest ein Teil dieser ROS Produktion über den oben beschriebenen Mechanismus zustande kommen könnte (d.h., einen Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ und damit ungünstige Effekte auf die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme und antioxidative Regeneration).

5.2.1. Effekte von ET-1 auf Zellverkürzung, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $[\text{Na}^+]_i$

Um dies zu testen, untersuchten wir den Effekt von ET-1 auf die Zellverkürzung, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $[\text{Na}^+]_i$ in Meerschweinchen-Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden bei einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert und dann ET-1 in aufsteigenden, kumulativen Konzentrationen in die Superfusionslösung eingebracht. ET-1 führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Amplitude

der Zellverkürzung von basal 3,41 % auf maximal 6,95 % (**Abb. 21A, B**). Der halbmaximale Effekt von ET-1 (EC_{50}) lag hierbei bei ~ 2 pmol/l. Um zu ermitteln, ob diese Zunahme der Zellverkürzungsamplitude auf eine Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) zurückzuführen ist, applizierten wir nach der letzten ET-1-Konzentration den PKC-Inhibitor Chelerythrin. In der Tat wurde die Zellverkürzung unter Chelerythrin auf ein Niveau vergleichbar mit der Zellverkürzung vor Zugabe von ET-1 reduziert, was suggeriert, dass PKC den ET-1 vermittelten Anstieg der Zellverkürzung mediert. Um abzuschätzen, wie ausgeprägt der Anstieg der Zellverkürzung im Vergleich zu der maximal hormonell zu erreichenden Zellverkürzung durch β -adrenerge Stimulation war, wurde am Ende des Experiments der β -adrenerge Rezeptor-Agonist Isoprenalin eingewaschen. Dieser erhöhte die Zellverkürzungsamplitude auf durchschnittlich 13,1 % (**Abb. 21B**). Der Effekt von ET-1 entsprach demnach 38 % des maximalen Effektes von Isoprenalin (**Abb. 21A, B**). Allerdings stellten wir hier bereits fest, dass dieser Effekt nur in solchen Zellen zu beobachten war, die eine eher niedrige Verkürzungsamplitude unter basalen Bedingungen aufwiesen, während in solchen Zellen, die bereits eine stärkere Zellverkürzung zeigten, kein Effekt oder sogar eine Abnahme der Verkürzungsamplitude zu beobachten war.

Die Effekte von ET-1 wurden in diesem ersten Protokoll bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz untersucht. Die physiologische Herzfrequenz von Meerschweinchen-Herzen liegt jedoch eher im Bereich von 3 Hz. Wir testeten daher den Einfluss von ET-1 auf die Zellverkürzung bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen (0,2 – 3 Hz). Hierbei wurde die erste Frequenzabhängigkeit in der Abwesenheit, die zweite in der Anwesenheit von 0,1 nmol/l ET-1 durchgeführt. Hiernach wurde ET-1 ausgewaschen und Isoprenalin (5 nmol/l) eingewaschen (**Abb. 21C**). Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der $[Na^+]_i$ die Amplitude cytosolischer Ca^{2+} Transienten insbesondere bei niedrigen Stimulationsfrequenzen erhöht, da hierbei die Na^+ -abhängigen Effekte auf den NCX, der eine eher langsame Kinetik aufweist, am stärksten ausgeprägt sind. In der Tat war zu beobachten, dass die ET-1-abhängige Erhöhung der Zellverkürzungsamplitude bei geringen Stimulationsfrequenzen am stärksten ausgeprägt war. Bei einer Frequenz von 3 Hz war nach ET-1 keine Zunahme der

Zellverkürzungsamplitude gegenüber den Kontrollbedingungen mehr zu beobachten (**Abb. 21C**). Im Gegensatz dazu erhöhte die β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin unter allen Stimulationsfrequenzen deutlich die Amplitude der Zellverkürzung. In ähnlicher Weise wie die fraktionelle Zellverkürzung wurden auch die Geschwindigkeiten der Zellverkürzung sowie die Relaxationsgeschwindigkeit durch ET-1 und Isoprenalin beeinflusst (**Abb. 22**). Diese Daten könnten einen ersten Hinweis darauf geben, dass die Erhöhung der Zellverkürzungsamplitude durch ET-1 tatsächlich auf eine Erhöhung der $[Na^+]_i$ zurückzuführen sein könnte, was eine erhöhte $[Ca^{2+}]_c$ nach sich ziehen würde.

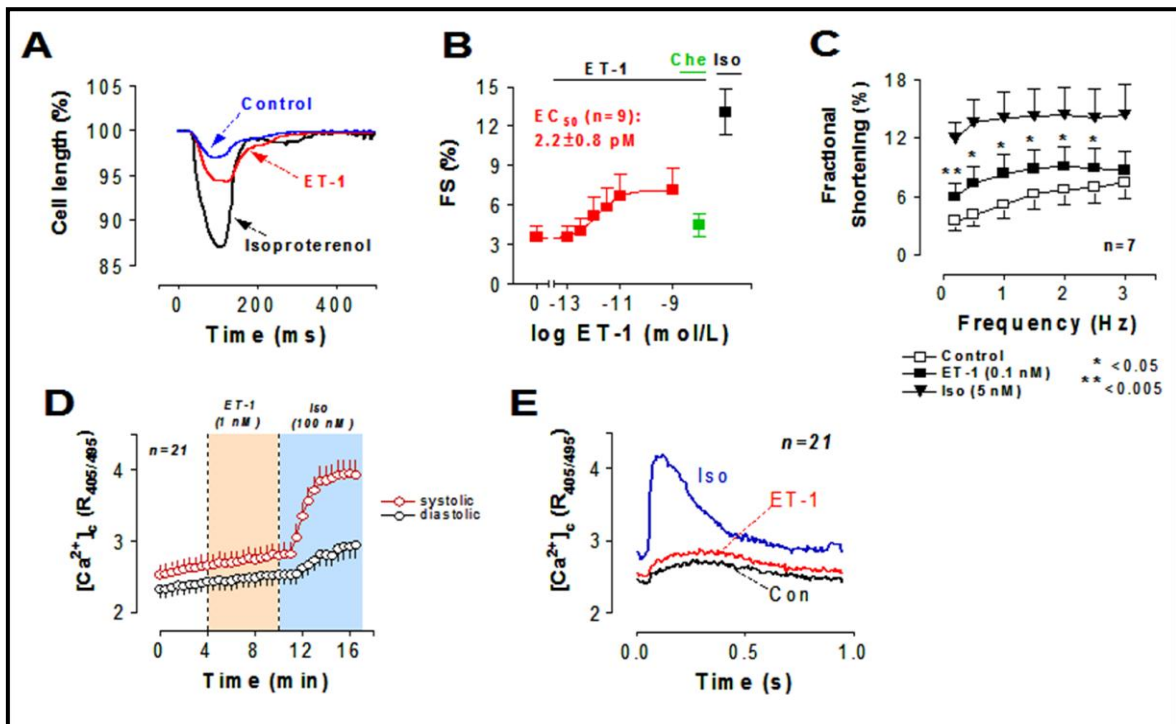


Abbildung 21: Effekt von ET-1 auf die Zellverkürzung und $[Ca^{2+}]_c$. Feld-stimulierte (0.5 Hz) Meerschweinchen-Kardiomyozyten wurden ET-1 ausgesetzt und die Zellverkürzung (A-C) und $[Ca^{2+}]_c$ durch Indo-1 AM (D, E) bestimmt. A, Repräsentative Einzelverkürzungen und kumulative Effekte von ET-1 (1 nM) im Vergleich zu Isoproterenol. B: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für ET-1; anschließend Einwaschen des PKC-Inhibitors Chelerythrine (CHE) und Isoproterenol (Iso). C: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung in der Abwesenheit (Control) und Gegenwart von ET-1 oder Isoproterenol. D: Zeitlicher Verlauf. E: Einzeltransienten von $[Ca^{2+}]_c$ nach Zugabe von ET-1 oder Iso. Experimente D+E durchgeführt von Fr. Dr. M. Dudenhöfer.

Um dies näher zu untersuchen, wurde als nächstes der Effekt von ET-1 auf die cytosolische Ca^{2+} Konzentration ($[Ca^{2+}]_c$) untersucht, da eine Erhöhung von $[Na^+]_i$ auch zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_c$ führt. Wir beluden hierfür Kardiomyozyten mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Indo-1, der eine ratiometrische Bestimmung der $[Ca^{2+}]_c$ erlaubt. Wir verwendeten nur *eine* Konzentration ET-1, bei der in den vorherigen Experimenten eine maximale Zunahme der Zellverkürzung zu beobachten war (1

nmol/l). Diese Konzentration ließen wir für 6 Minuten auf die Zelle einwirken, bevor wir als Positivkontrolle den β -AR-Agonisten Isoprenalin (100 nmol/l) hinzufügten. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz beobachteten wir hierunter keinen bedeutsamen Anstieg der diastolischen oder systolischen $[Ca^{2+}]_c$ unter ET-1, allerdings einen deutlichen Effekt auf die Amplitude des Ca^{2+} Transienten durch die Zugabe von Isoprenalin (**Abb. 21E**). Hierunter kam es auch zu einer leichten Zunahme der diastolischen $[Ca^{2+}]_c$.

Da die Effekte von ET-1 auf die Zellverkürzung innerhalb weniger Minuten einsetzten, war es überraschend zu beobachten, dass die Effekte auf $[Ca^{2+}]_c$ innerhalb von 6 Minuten nicht eintraten. Wir vermuteten daher, dass eine längere Einwirkzeit von ET-1 notwendig sein könnte und verlängerten diese daher auf 40 Minuten. Darüber hinaus erhöhten wir die Konzentration von ET-1 auf 100 nmol/l. Schließlich verwendeten wir noch einen weiteren Ca^{2+} -Indikator mit einem besserem Signal/Rauschen-Verhältnis (Fluo-4), um auch kleinere Veränderungen der $[Ca^{2+}]_c$ nicht zu übersehen. Fluo-4, dessen Exzitationswellenlänge (λ_{exc}) bei 485 nm und Emissionswellenlänge (λ_{em}) bei 525 nm liegt, ist im Gegensatz zu Indo-1 kein ratiometrischer Farbstoff.

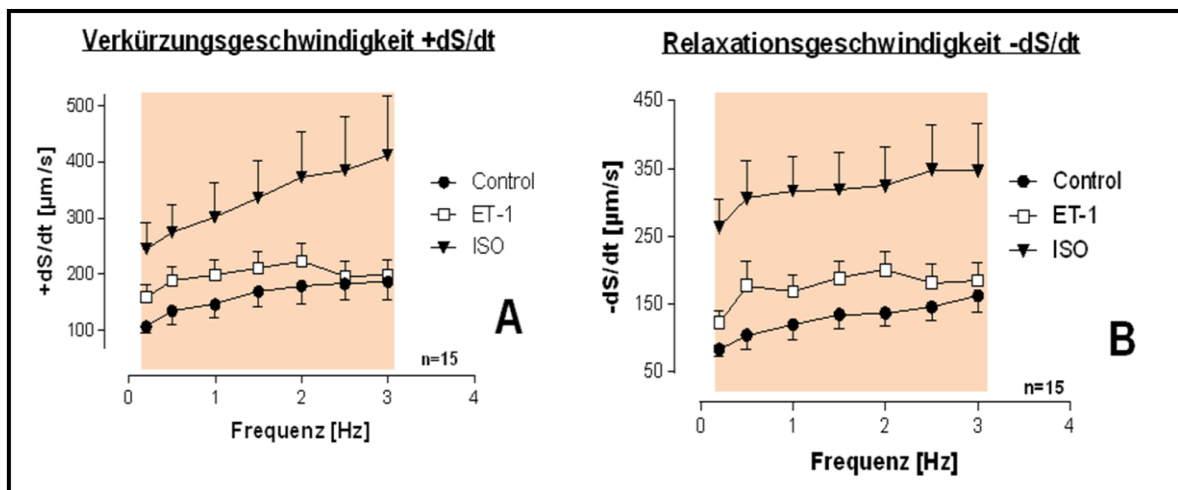


Abbildung 22: A: Einfluss der Frequenz auf die Verkürzungsgeschwindigkeit (+dS/dt) unter Normalbedingungen/Endothelin (ET-1, 10^{-10} mol/l)/Isoprenalin (ISO), x-Achse: Frequenz in Hertz (Hz), y-Achse: Verkürzungsgeschwindigkeit (+dS/dt) in Mikrometer/Sekunde ($\mu\text{m/s}$). B: Einfluss der Frequenz auf die Relaxationsgeschwindigkeit (-dS/dt) unter Normalbedingungen/Endothelin (ET-1, 10^{-10} mol/l)/Isoprenalin (ISO), x-Achse: Frequenz in Hertz (Hz), y-Achse: Relaxationsgeschwindigkeit, (-dS/dt) in Mikrometer/Sekunde ($\mu\text{m/s}$)

Zusammen mit Fluo-4 bestimmten wir die Autofluoreszenz von NAD(P)H/NAD(P)⁺ (bei λ_{exc} =340 nm und λ_{em} =450 nm) in denselben Zellen, um Hinweise darauf zu bekommen, ob es durch ET-1 zu einer Oxidation des Redoxstatus in

Mitochondrien kommen könnte. Nach 40 Minuten Inkubation mit ET-1 (bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz) wurde ET-1 ausgewaschen und Isoprenalin als Positivkontrolle eines $[Ca^{2+}]_c$ -steigernden Rezeptoragonisten eingebracht. Da dieses Experiment über insgesamt mehr als eine Stunde abließ, bildeten wir noch eine Gruppe als Negativkontrolle, in der zwar kein ET-1 appliziert wurde, jedoch Isoprenalin zum gleichen Zeitpunkt wie in der ET-1-Gruppe (am Ende des Experimentes). Hierdurch kontrollierten wir den in vitro-bedingten „rundown“ des cytosolischen Ca^{2+} - Transienten, um nicht einen falsch-negativen Effekt von ET-1 auf Ca^{2+} -Transienten abzuleiten. Die Zugabe von Isoprenalin am Ende auch des Kontrollexperimentes lässt kontrollieren, ob die ET-1-Inkubation einen Einfluss auf β -adrenerge Stimulation hat, zum Beispiel durch Rezeptor-„cross-talk“ zwischen $G_{q/11}$ - und G_s -gekoppelten Rezeptoren.

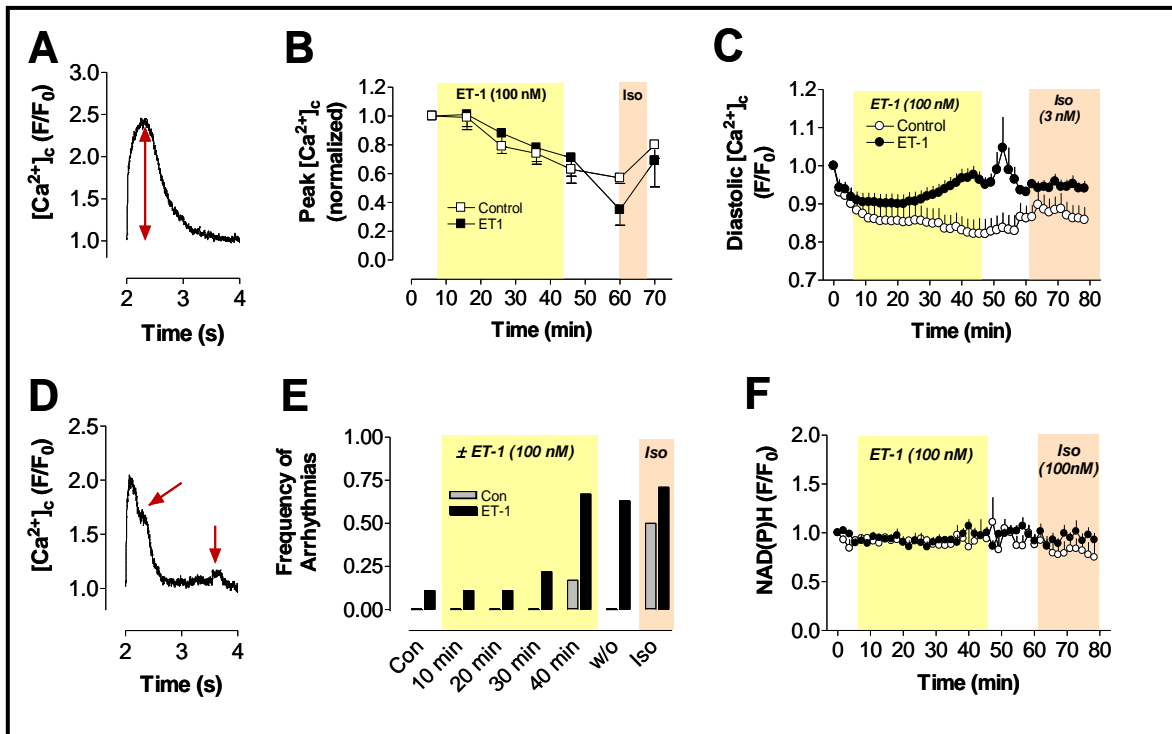


Abbildung. 23: Effekt von ET-1 auf $[Ca^{2+}]_c$ und den Redox-Status von NAD(P)H/NAD(P)⁺. Myozyten wurden mit Fluo-4 beladen und dessen Fluoreszenz zusammen mit der Autofluoreszenz von NAD(P)H bestimmt. A: repräsentativer Ca^{2+} -Transient vor Zugabe von ET-1. Effekt von ET-1 im Vergleich zu Isoproterenol (Iso) auf maximales (B) und diastolisches $[Ca^{2+}]_c$ (C). D: Typisches Auftreten von Arrhythmien nach ET-1. E: Häufigkeit der Arrhythmien zu den angezeigten Zeitpunkten. F: Einfluss von ET-1 und Iso auf den Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)⁺ (normalisiert auf den Ausgangswert). Experimente durchgeführt von Fr. Dr. M. Dudenhöfer.

Auch in diesen Experimenten zeigte sich selbst nach 40 Minuten ET-1-Inkubation keine Steigerung der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten (**Abb. 23B**), allerdings kam es nach ~20 Minuten zu einem Anstieg des diastolischen $[Ca^{2+}]_c$ (**Abb. 23C**) sowie zum Auftreten von Arrhythmien (**Abb. 23D, E**). Der Redox-Status von

NAD(P)H/NAD(P)⁺, welcher sich in unseren bisherigen Experimenten umgekehrt proportional zur H₂O₂ Produktion verhielt⁶³ und somit als Indikator für oxidativen Stress verwendet werden kann (**Abb. 23F**), blieb bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz jedoch unverändert (**Abb. 23F**). Auch einen Anstieg der [Na⁺]_i, wie er in anderen Spezies beschrieben ist,² konnten wir in diesen Meerschweinchen-Myozyten nicht beobachten (Experimente von Dr. Alexander Nickel; Daten nicht gezeigt).

5.2.2. Effekte von ET-1 auf die Zellverkürzung mittels Konzentrations-Wirkungs-Kurve und Langzeit-Verlauf

Da in vorher beschriebenen Langzeitversuch mit 40 minütiger ET-1-Inkubation keine Steigerung der Calcium-Transienten-Amplitude beobachtet wurde, wollten wir verifizieren, dass hierunter dennoch die Zellverkürzung zunahm, wie es in unseren initialen Experimenten beobachtet wurde (**Abb. 21B**). Wir führten daher ein Experiment durch, bei dem Kardiomyozyten für 40 Minuten ET-1 ausgesetzt wurden und bestimmten hierbei die Zellverkürzung. Im Langzeitverlauf des Verkürzungsverhaltens der Kardiomyozyten unter kontinuierlicher Applikation von ET-1 in einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l lässt sich zunächst ein deutlicher Anstieg der Kontraktion im Vergleich zu Normalbedingungen verzeichnen. Die Fractional Shortening steigt von 5 % auf Werte bis zu 18 % an, was einer mehr als dreifachen Steigerung der Kontraktilität gleichkommt.

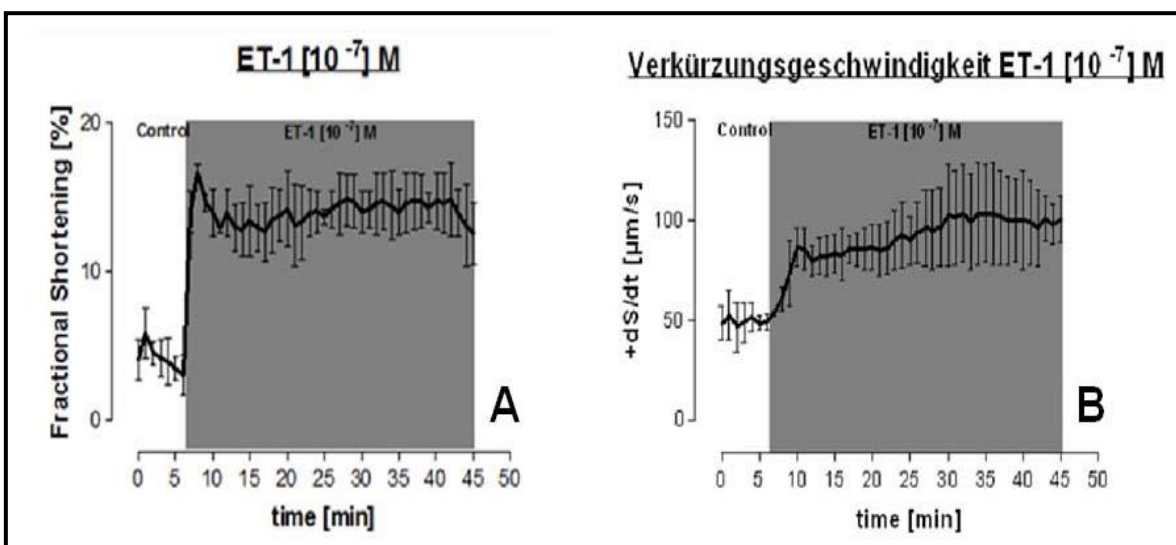


Abbildung 24: A: Langzeitverlauf der Zellverkürzung unter Endothelin-1 (10⁻⁷ mol/l), x-Achse: Zeit in Minuten (min), y-Achse: Fractional Shortening in Prozent (%). B: Langzeitverlauf der Verkürzungsgeschwindigkeit unter Endothelin-1 (10⁻⁷ mol/l), x-Achse: Zeit in Minuten (min), y-Achse: Verkürzungsgeschwindigkeit (+dS/dt) in Mikrometer/Sekunde (µm/s).

Dieser Effekt hält jedoch nicht lange an. Nach einem Peak der Kontraktilitätszunahme lässt sich dann ein Abfall der Fractional Shortening auf etwa 13-14 % beobachten. Die Zelle kann also die maximale Leistung nicht lange halten und fällt anschließend auf niedrigere Kontraktionswerte ab, welche jedoch immer noch mehr als doppelt so groß sind als unter Normalbedingungen (**Abb. 24A**). Schaut man sich für diesen Versuch den Verlauf der Verkürzungsgeschwindigkeit an, so lässt sich auch hier ein deutlicher Anstieg unter ET-1 im Vergleich zu den Kontrollbedingungen verzeichnen. Im Unterschied zur Fractional Shortening sieht man hier jedoch keinen Peak mit anschließendem Abfall der Leistung, sondern einen stetigen Anstieg der Verkürzungsgeschwindigkeit für die Dauer des Versuches. Die Verkürzungsgeschwindigkeit liegt unter Kontrollbedingungen bei etwa 50 $\mu\text{m/s}$ und erreicht im Verlauf ein Maximum von 90 $\mu\text{m/s}$, hat sich also fast verdoppelt (**Abb. 24B**).

In **Abb. 25** zeigt sich in Einzeltransienten dargestellt die deutliche Kontraktilitätszunahme und Verkürzung des time-to-peak unter zeitlich zunehmender Endothelin-1 Applikation in einer Konzentration von 10^{-7} Mol.

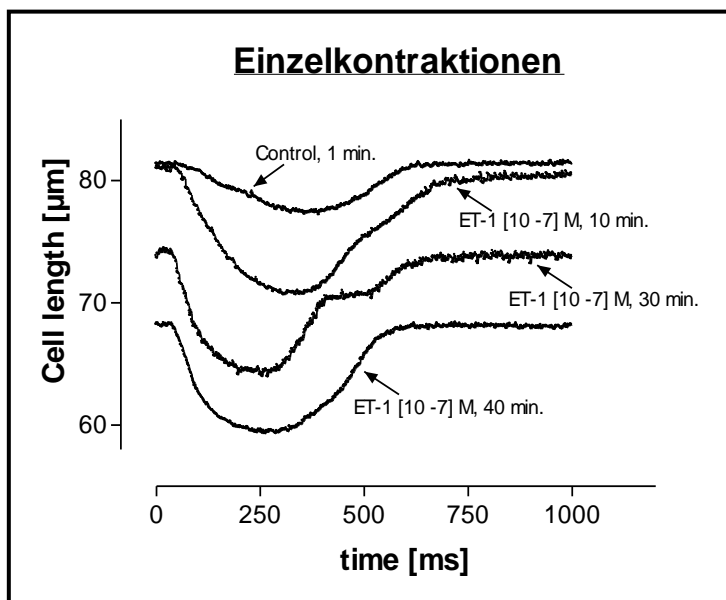


Abbildung 25: Gemittelte Transienten unter Kontrollbedingungen, Endothelin-1 (ET-1) 10^{-7} mol nach einer Applikationszeit von 10, 30 und 40 Minuten. x-Achse: Zeit in Millisekunden (ms), y-Achse: Prozentuale Verkürzung der Zelle im Vergleich zur diastolischen Zelllänge (%)

5.2.3. Effekte von ET-1 und Ang II auf die ROS-Produktion

Um zu untersuchen, ob ET-1 die intrazelluläre ROS-Produktion steigert, wurden Myozyten mit dem H_2O_2 -sensitiven Farbstoff CM-DCF beladen. Die mitochondriale ROS-Produktion ist u. a. abhängig vom Elektronenfluss an der Atmungskette und ein Anstieg der Arbeitslast der Zelle erhöht die ADP-induzierte Atmung und somit auch die ROS-Produktion.^{46, 62} Wir führten daher ein Experiment durch, bei dem die ROS-Produktion mit CM-DCF in isolierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten bei ansteigenden Stimulationsfrequenzen gemessen wurde (1-4 Hz für jeweils 2-3 Minuten pro Frequenz).

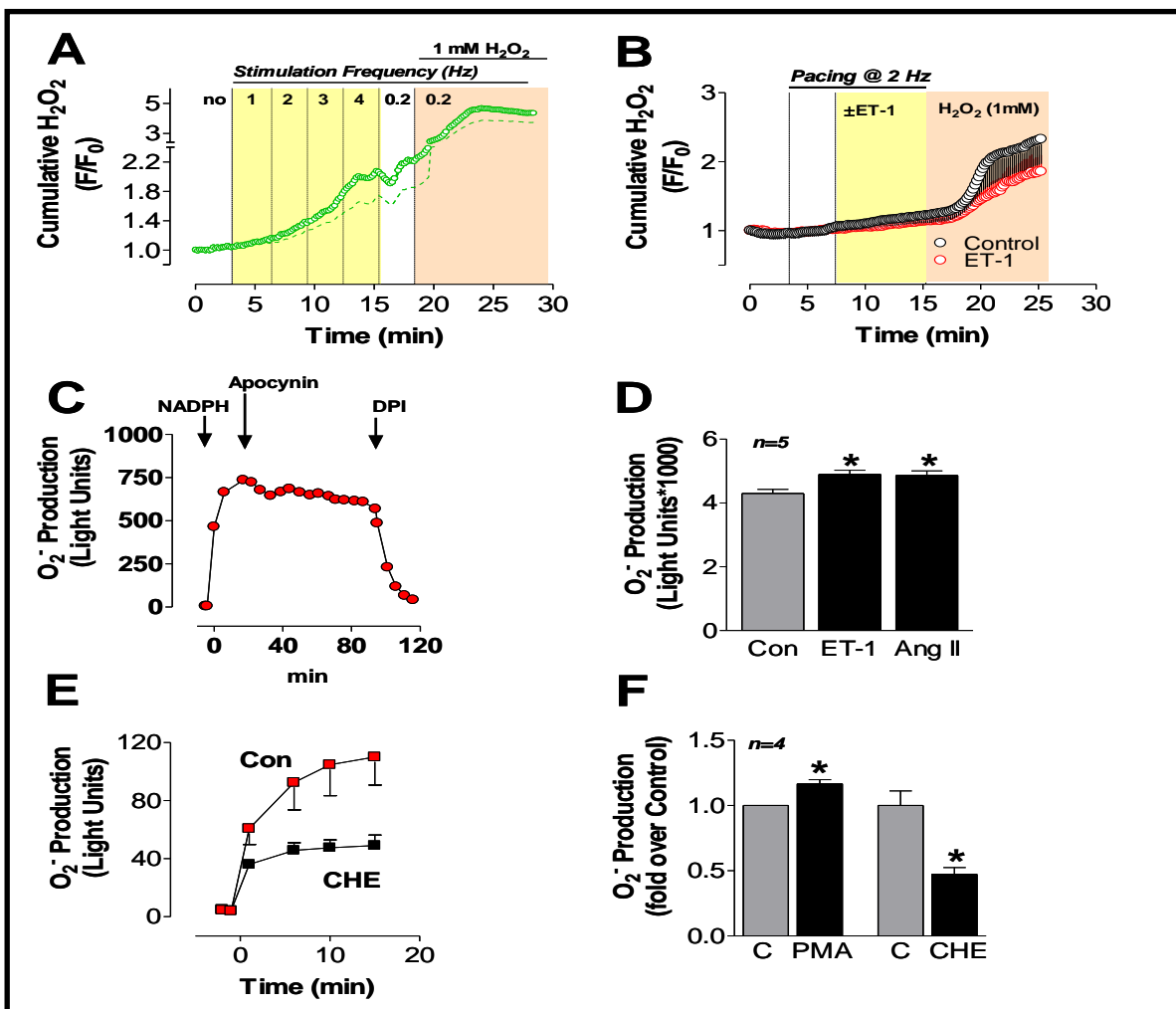


Abbildung 26: Keine relevante Steigerung der intrazellulären ROS-Produktion nach ET-1- oder Ang II-Stimulation in Meerschweinchen-Kardiomyozyten. A: Kumulative H_2O_2 -Produktion (DCF-Fluoreszenz) in isolierten Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz. Als Positivkontrolle wurde am Ende jeweils 1 mM H_2O_2 eingewaschen. B: Effekt von ET-1 (100 nM/l) auf intrazelluläre H_2O_2 -Produktion bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. C: NADPH-abhängige O_2^- Produktion in Homogenaten von Kardiomyozyten (Lucigenin-Chemilumineszenz). Apocynin (hier 50 μM), als NADPH-Oxidase-Inhibitor gehandelt, reduzierte die O_2^- Produktion nur wenig. 1 mM Apocynin reduzierte diese jedoch um ~50 % mit langsamer Kinetik (nicht gezeigt) und DPI inhibierte sie vollständig. D: Effekt von ET-1 oder Ang II (je 100 nM/l) auf NADPH-Oxidase vermittelte O_2^- -Generation. Effekt des PKC-Inhibitors Chelerythrin (CHE; E, F) oder des PKC-Aktivators PMA (F) auf die NADPH-Oxidase-Aktivität. * $p < 0.05$ vs. Control. Experimente durchgeführt von Fr. Dr. M. Dudenhöffer (A, B) und Dr. A. Knopp (C-F).

Am Ende dieser Stimulation wurde die Frequenz auf 0,2 Hz zurückgesetzt und anschließend eine hohe extrazelluläre Konzentration (1 mmol/l) von H_2O_2 als Positivkontrolle für die Funktionalität des Farbstoffes eingesetzt. In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass CM-DCF überwiegend in Mitochondrien lokalisiert ist⁶. Ein Anheben der Feld-Stimulationsfrequenz auf 4 Hz führte in Kardiomyozyten zu einem deutlichen Anstieg der H_2O_2 Emission (**Abb. 26A**).

Um nun zu untersuchen, ob ET-1 in schlagenden Kardiomyozyten (Frequenz 2 Hz) zu einer relevanten Steigerung der H_2O_2 -Emission führt, wurden Kardiomyozyten bei 2 Hz stimuliert und hierunter ET-1 in einer Konzentration von 100 nmol/l für 7 Minuten appliziert. Hierunter kam es im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die keinem ET-1 ausgesetzt wurde, zu keiner Zunahme der intrazellulären H_2O_2 -Emission. Als Positivkontrolle diente die extrazelluläre Applikation von 1 mmol/l H_2O_2 , welches in beiden Gruppen zu einer vergleichbaren Zunahme der CM-DCF-Fluoreszenz führte (**Abb. 26B**).

Diese Daten zeigen, dass ET-1 in adulten ventrikulären Meerschweinchen-Myozyten zu keiner detektierbaren Zunahme der intrazellulären H_2O_2 -Emission führt. Dies könnte bedeuten, dass a) die intrazelluläre ROS-Produktion nach ET-1 sehr gering ist und jenseits der Sensibilität von CM-DCF liegt und/oder b) ET-1 durch Stimulation der NADPH-Oxidase zu einer eher nach extrazellulär gerichteten ROS-Produktion führt und/oder dass ET-1 in Kardiomyozyten zu keiner relevanten ROS-Produktion führt. Da der von uns verwendete Farbstoff (DCF) primär in Mitochondrien lokalisiert ist⁶, spekulierten wir, dass die Stimulation der NADPH-Oxidase durch ET-1 nicht sensitiv erfasst würde. Um dies zu kontrollieren, führten wir Experimente mit dem sog. NADPH-Oxidase-Assay durch, bei dem an homogenisierten Kardiomyozyten nach Zugabe von NADPH die Superoxidproduktion (O_2^-) mittels Lumineszenz von Lucigenin sensitiv erfasst werden kann.

5.2.4. Effekte von ET-1 auf die NADPH-Oxidase-Aktivität in Kardiomyozyten

Die NADPH-Oxidase-Aktivität wurde anhand der NADPH-induzierten Zunahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -sensiblen Lumineszenz von Lucigenin an homogenisierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten bestimmt. Die Zugabe von NADPH führt hierbei innerhalb weniger Minuten zu einer deutlichen Zunahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion. Nach Applikation von Apocynin (50 $\mu\text{mol/l}$), einem vermeintlich spezifischen NADPH-Oxidase-Inhibitor, kam es nur zu einer leichten Abnahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion. Die Applikation einer höheren Apocynin-Konzentration (1 mmol/l) reduzierte die $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion allerdings zu etwa 50 % (**Abb. 27**). DPI hingegen, welches nicht-spezifisch Flavoproteine der NADPH-Oxidase, aber auch der Atmungskette in Mitochondrien, inhibiert, führte zu einer fast vollständigen Blockade der NADPH-Oxidase-Aktivität. Weiterhin konnte die $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion durch Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) um etwa 30 %, durch Zugabe des direkten Radikalfänger TEMPOL jedoch um nahezu 100 % reduziert werden. Im Gegensatz dazu konnte die $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion nicht durch Inhibitoren von NO-Synthasen (L-NAME) oder der Xanthin-Oxidase (Allopurinol) reduziert werden, was eine relevante NADPH-abhängige $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion durch diese Enzyme weitgehend ausschließt. Die Zugabe von Antimycin A, einem Inhibitor des Komplex III der Atmungskette und klassischem Aktivator mitochondrialer $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion⁶, führt zu einer Zunahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion, was die Gegenwart von Mitochondrien in dieser Präparation bestätigt. Tatsächlich kam es in diesem sensiblen Testsystem für $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion zu einer leichten, aber konsistenten Zunahme der NADPH-Oxidase-abhängigen $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion durch ET-1, aber auch Angiotensin II (**Abb. 26D**).

Die Tatsache, dass die Zugabe von ET-1 oder Ang II zu nur einer leichten Zunahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion führte, ließ den Verdacht aufkommen, dass die NADPH-Oxidase in diesem System (homogenisierte Kardiomyozyten, die vorher durch enzymatische Isolation isoliert wurden) bereits voraktiviert sein könnte. Ein klassischer Aktivator der NADPH-Oxidase ist PKC, welches auch durch Ischämie/Reperfusion aktiviert werden kann und bei der Zellisolation werden diese einer passageren artifiziellen Ischämie (bzw. Hypoxie) mit Reoxygenierung ausgesetzt. In der Tat führte die Zugabe von Chelerythrin, einem globalen Inhibitor

aller PKC-Untereinheiten, zu einer ca. 50 %igen Inhibition der NADPH-abhängigen $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion (**Abb. 26E**), während die Zugabe des unspezifischen PKC-Aktivators PMA zu einer nur geringen Zunahme der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion führte, im Ausmaß vergleichbar mit dem Effekt von ET-1 und Ang II, welche die NADPH-Oxidase auch über die PKC aktivieren (**Abb. 26F und Abb. 3 - Schema**).

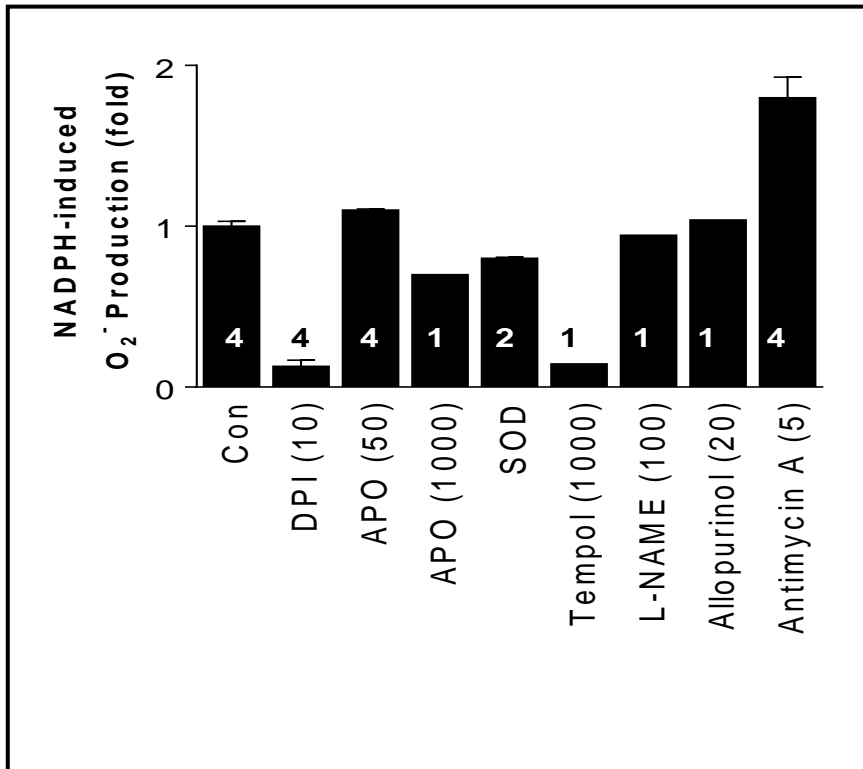


Abbildung 27: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf NADPH-induzierte O_2^- -Produktion
x-Achse: Con: Kontrolle, DPI: Diphenyliodonium 10 $\mu\text{mol/l}$, APO: Apocynin 50 und 1000 $\mu\text{mol/l}$, SOD: Superoxiddismutase, Tempol: 1000 $\mu\text{mol/l}$, L-NAME: NG-Nitro-L-Argininmethylester 100 $\mu\text{mol/l}$, Allopurinol: 20 $\mu\text{mol/l}$, Antimycin A: 5 $\mu\text{mol/l}$, y-Achse: O_2^- -Produktion. Experimente durchgeführt von Dr. A. Knopp.

6. Diskussion

6.1. Effekte exogener ROS auf die elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik

In der Perikardflüssigkeit herzinsuffizienter Patienten konnte laut aktueller Datenlage eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Das Ausmaß des oxidativen Stresses korrelierte dabei mit dem Ausmaß der linksventrikulären Dysfunktion^{14, 31, 75}. Die zellulären Effekte der ROS sind sehr vielfältig und beeinträchtigen unter anderem direkt die elektromechanische Kopplung^{36, 38}. Durch eine ROS-induzierte ROS-Freisetzung aus Mitochondrien, welche über den *inner membran anion channel* (IMAC)^{4, 6} oder den *permeability transition pore* (PTP)¹²⁴ stattfindet, kommt es zu einer koordinierten teils passageren Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Durch temporäres Sistieren der ATP-Produktion führt dies zur Aktivierung sarkolemmaler K_{ATP} -Kanäle, welche die Dauer des Aktionspotentials und somit die Erregbarkeit der Zelle beeinflussen⁶. Durch ein Absinken der zellulären ATP-Produktion werden zudem ATP-abhängige Ionentransporter beeinflusst, hier vor allem die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch unmittelbar die kardiale Kontraktilität beeinflusst wird. Den Einfluss von ROS auf die elektromechanische Kopplung und damit auf die kardiale Kontraktilität wurde in unseren Versuchen an elektrisch stimulierten Meerschweinchen-Kardiomyozyten dargestellt.

Endothelin-1 bewirkt durch Stimulation $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren (ET_A -R) und Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers (NHE) eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration ($[Na^+]_i$). Dies führt wiederum bedingt durch die höheren Natrium-Konzentrationen zu einer Stimulation des reversen Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (revNCX) und dies zu einem positiv inotropen Effekt². Aufgrund der gleichzeitigen durch ET_A -R bedingten Aktivierung der PKC wollten wir die positiv inotropen Effekte des Endothelin-1 separat dargestellt sehen. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass eine Applikation von Endothelin-1 auf Kardiomyozyten, an welchen die elektromechanische Kopplung stattfindet, zu einer deutlichen Steigerung der Kontraktilität führt (**Abb. 21**). Dieser Effekt war

nicht nur für die Kontraktilität an sich, sondern auch für die Verkürzungsgeschwindigkeit (V_m) nachweisbar (**Abb. 21A**). Jedoch zeigte sich nach anfangs deutlicher Zunahme der Kontraktilität im Verlauf trotz Applikation höherer Dosierungen an ET-1, dass die Kardiomyozyten ein Plateau ihrer Kontraktilität erreichten, welcher durch noch höhere Gaben an ET-1 nicht zu verändern war. Dies lässt sich zum einen durch eine Sättigung der ET_A -Rezeptoren durch Endothelin erklären, so dass höhere Mengen an ET-1 keine Bindungsmöglichkeit an der Zelle mehr hatten. Zum anderen besteht die Möglichkeit der Erschöpfung der NHE und revNCX, welche ihre maximale Leistung zur Inotropie ausgereizt hatten. In weiteren Arbeiten ist beschrieben, dass Endothelin-1 die Transkription des Calcium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA2) herabsetzt^{119, 120, 121}. Diese SERCA ist jedoch für den Transport des Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum während der Kontraktion notwendig, so dass dies ebenfalls eine Möglichkeit ist, den zunächst steilen, dann jedoch konstant bleibenden Anstieg der Kontraktilität unter steigenden ET-1-Dosierungen zu erklären. Denselben Effekt konnten wir unter einer kontinuierlichen länger dauernden Applikation von Endothelin-1 in gleicher Dosierung auf die Cardiomyozyten beobachten. Nach anfangs deutlicher Steigerung der Kontraktilität zeigten sich im Verlauf eine Stabilisierung auf einem Plateau und sogar eine leichte Regredienz der Kontraktilität auf jedoch immer noch höherem Niveau als unter Kontrollbedingungen.

Zur weiteren Untersuchung der Kontraktilitätssteigerung führten wir einen Versuch zur Kraft-Frequenz-Beziehung durch (**Abb. 23**), zunächst unter Kontrollbedingungen, anschließend unter zusätzlicher Applikation von Endothelin-1 sowie Isoprenalin. Im Vorhinein hatten wir die überlegen inotrope Wirkungsweise des Isoprenalins über das Endothelin-1 verdeutlicht. Bereits in anderen Arbeiten wurde demonstriert, dass eine Steigerung der Frequenz zu einer Steigerung der Kraft/Kontraktilität führt. Dies führt man zurück auf die Menge des im sarkoplasmatischen Retikulums befindlichen Reserve-Calciums sowie dem Calcium-Fluss über das SR via L-Typ-Kanälen sowie dem Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX)³⁵. Wir konnten in unseren Versuchen die Datenlage bestätigen. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich mit zunehmender Herzfrequenz (0,2-3 Hz) ein

stetiger Anstieg der Kontraktilität. Unter Applikation des Endothelin-1 zeigte sich allein durch ET-1-Anwesenheit, wie in den vorhergehenden Versuchen beschrieben, bereits ein Anstieg der *fractional shortening*. Durch Steigerung der Frequenz konnte man zunächst eine weitere Steigerung der Kontraktilität beobachten, welche aber mit zunehmender Kontraktionsgeschwindigkeit ein Plateau erreichte und letztendlich im Bereich zwischen zwei und drei Hertz sogar wieder abnahm. Den gleichen Effekt konnte man unter Isoprenalin-Applikation beobachten. Ähnlich wie die Kontraktilität war auch der Verlauf der Verkürzungs (V_m)- und Relaxations (R_m)-Geschwindigkeit (**Abb. 24A, B**). Die Erklärung hierfür liegen am ehesten bei einer Erschöpfung der Calciumreserve im SR sowie des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers. Eine weitere Erklärung der Abnahme der Transienten könnte auch die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sein, welche unter diesen Stressbedingungen vermehrt anfallen und die Signalwege und auch die Zellhomöostase an sich schädigen³⁵. In weiteren Arbeiten wird zudem eine erhöhte Konzentration an intrazellulärem Natrium ($[\text{Na}^+]_i$) für die Abnahme der Kontraktilität unter maximalen Stressbedingungen verantwortlich gemacht^{76, 106}. Diese erhöhte Natriumkonzentration würde wiederum den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktivieren und damit eine Gewährleistung des ausreichenden Calciumangebotes an das sarkoplasmatische Retikulum beeinträchtigen.

Der $\cdot\text{OH}$ -induzierte Anstieg der diastolischen Calcium-Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (**Abb. 19C, D**) trägt zum Anstieg der diastolischen Spannung in der Zelle bei (**Abb. 17B**) und könnte assoziiert sein mit der $\cdot\text{OH}$ -induzierten Inhibierung der Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase^{17, 36} und Aktivierung von NCX (rev)¹²². Beide Abläufe sind vereinbar mit einer Verlangsamung der Relaxation. Die Inhibierung der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase reduziert die Konzentration des Calciums im sarkoplasmatischen Retikulum und reduziert damit die Amplitude der Calcium-Transienten (**Abb. 19C**) sowie die gebildete Spannung (**Abb. 19B**). Dieser Zusammenhang wird unterstützt durch die Enge Assoziation zwischen dem Anstieg der diastolischen Spannung und der Verlangsamung der Relaxation (diese Kausalität wurde bereits in früheren Arbeiten unserer Forschungsgruppe an isolierten Herzmuskelstreifen demonstriert⁷¹) sowie der Reduktion der

Zellverkürzung in isolierten Myozyten (**Abb. 19B**). Weiterhin oxidiert $\cdot\text{OH}$ rasch NADH (**Abb. 19H**), welches als Elektronen-Donor des Elektronentransfer-Zyklus fungiert. Dies könnte vergesellschaftet sein mit der Inaktivierung von Enzymen des Krebs-Zyklus (v.a. Aconitase³⁹) aufgrund des Verbrauchs von Reduktionsäquivalenten durch die Glutathion-Peroxidase und/oder direktes Ausschleusen von ROS durch NAD(P)H⁸⁷. Zusammen mit $\cdot\text{OH}$ -induzierten Schäden der ETC-Komponenten¹²³, könnte dies der Grund sein für die leichte Dissipation von $\Delta\Psi_m$ (**Abb. 19F**), der treibenden Kraft der ATP-Produktion⁷³. Da die mitochondriale ATP-Produktion eng verbunden ist mit der Aktivierung von $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ ²², könnte dies wesentlich zu der Hyperpolarisierung von E_m (**Abb. 19F**), der Verkürzung von APD_{50} (**Abb. 19C, E**) und der Tatsache, dass die Hyperpolarisation von E_m während $\cdot\text{OH}$ -Exposition eng mit der Dissipation von $\Delta\Psi_m$ korreliert (**Abb. 19G**), beitragen.

Bei der Verlängerung der Expositionszeit von $\cdot\text{OH}$ auf 15 Minuten, trat eine irreversible Dissipation von $\Delta\Psi_m$ auf, vorangegangen von einem Overload an cytosolischem und mitochondrialem Calcium (**Abb. 20**). Dies stimmt mit den Beobachtungen in neonatalen Ratten-Myozyten^{3, 110} überein und könnte in Zusammenhang mit der ROS- und Ca^{2+} -induzierten Aktivierung der MPTP^{3, 42} stehen. Obwohl die 15-minütige $\cdot\text{OH}$ -Exposition keine größere Dissipation von $\Delta\Psi_m$ oder E_m (**Abb. 19F**) induzierte, führt dies im menschlichen Myokard erstaunlicherweise nicht zu relevantem, irreversiblen Zellverlust⁷¹.

Tatsächlich ist in isolierten humanen Vorhoftrabekeln die abgestumpfte inotrope Reaktion auf $[\text{Ca}^{2+}]_o$ nach $\cdot\text{OH}$ oder Hypoxie/Reoxygenierung (welche nach Exposition von $\cdot\text{OH}$ oder Hypoxie/Reoxygenierung gleich stark abgeschwächt war – Doktorarbeit Rainer Dabew) reversibel durch β -adrenerge Stimulation. Dies bedeutet, dass in Übereinstimmung mit Beobachtungen in Säugetiermodellen der Ischämie/Reperfusion, die myokardiale Dysfunktion („Stunning“) reversibel war.

Im Gegensatz zu Tiermodellen, in denen eine Verringerung der myofilamentären Ca^{2+} -Antwort den Hauptmechanismus der kontraktile Dysfunktion¹⁷ darstellte, wurde eine Verschlechterung des Ca^{2+} -Haushalts im Säugetier-Modell

beobachtet⁵⁷. Schweine, die einer Ischämie und Reperfusion ausgesetzt wurden, hatten reduzierte Calcium-Transienten, was mit einer Reduktion der Ströme in L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und Dephosphorylierung von Phospholamban⁵⁷ korrelierte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse mit OH in isolierten Herzmuskelzellen, dass diese zu einem energetischen Defizit u. a. über die Oxidation des Elektronenlieferanten NADH führen, was über einen Mangel von ATP und die Aktivierung ATP-sensibler K_{ATP} Kanäle zu einer Hypoerpolarisation des sarkolemmalen Membranpotenzials führt und hierdurch den Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle verringert. Gleichzeitig könnte ein ATP Defizit die Aktivität der SERCA verringern, welche stark ATP-abhängig arbeitet. Hierdurch wird die Ca²⁺ Akkumulation ins SR und die Amplitude der cytosolischen Ca²⁺ Transienten verringert und gleichzeitig die diastolische [Ca²⁺]_c erhöht. Dies trägt zu einem Anstieg der diastolischen Spannung und somit zu einem Relaxationsdefizit der Zellen und zum „myokardialen Stunning“ bei. Die hier untersuchten Effekte von ROS auf die Herzmuskelzellfunktion repräsentieren am ehesten die Effekte einer dramatischen und passageren ROS Produktion bei Ischämie und Reperfusion im Herzen in vivo. Allerdings suggerieren Daten unserer Gruppe, dass auch bei einem Anstieg der kardialen Nachlast, wie er im in vivo Model der Aortenligatur zur Induktion einer Herzinsuffizienz genutzt wird, zu nekrotischem Zelltod und einer Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus führt, der vergleichbar mit der Applikation eines Zehntels der hier verwendeten ROS Menge entspricht (100 µmol/L H₂O₂; unpublizierte Daten; Abstract). Insofern ist denkbar, dass vergleichbare Effekte von ROS auf die Kontraktilität und Zelltod auch im insuffizienten Herzen stattfindet, allerdings in geringerem Umfang und mit langsamerer Kinetik als in den hier durchgeführten Experimenten.

6.2. Quellen einer intrazellulären ROS-Produktion in Kardiomyozyten

Die Daten der vorliegenden Studie legen nahe, dass in isolierten Kardiomyozyten die PKC bereits fast maximal aktiviert ist. Dies erscheint nicht ganz abwegig, da im Rahmen der Zellisolation eine gewisse Hypoxie mit Reoxygenierung erzeugt wird, und während Hypoxie bzw. Ischämie freigesetztes Adenosin die PKC über Adenosin-Rezeptoren stimulieren kann.²⁷ Eine voraktivierte PKC erschwert jedoch einen ET-1 oder Ang II-induzierten und PKC-medierten Effekt auf ROS-Produktion, aber auch auf $[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_c$. Wir führten daher Versuche durch, bei denen wir die PKC während oder nach der Zellisolation mit Chelerythrin hemmten. Allerdings konnten wir auch nach Auswaschen von Chelerythrin keine nennenswerten Effekte von ET-1 und Ang II auf $[Ca^{2+}]_c$, $[Na^+]_i$ und ROS Produktion detektieren.

Zusammenfassend beobachteten wir durch ET-1 (und z.T. Ang II) zwar eine geringe, aber inkonsistente Steigerung der Zellverkürzung in Meerschweinchen Myozyten, aber keine relevanten Effekte auf die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten, auf $[Na^+]_i$, den Redox-Status von NAD(P)H/NAD(P)⁺ oder die intrazelluläre ROS-Produktion. Eine bereits endogen vorhandene PKC-Aktivierung (**Abb. 25E, F**) könnte einen Teil dieser Beobachtungen erklären. Allerdings ist auch festzuhalten, dass trotz maximaler Stimulation der NADPH-Oxidase Aktivität (endogen plus ET-1; **Abb. 25D**) diese ROS Produktion eher gering ausgeprägt ist im Vergleich zu mitochondrial medierter ROS Produktion, die durch ein Anheben der Stimulationsfrequenz hervorgerufen wird (**Abb. 25A, B** und Heinzl et al.⁴⁶). Wir entschieden uns an diesem Punkt, das eigentlich verfolgte Projekt wegen der vermutlich eher geringen biologischen Relevanz der vermuteten Effekte von ET-1 und Ang II auf die ROS Produktion, aber auch der technischen Unwegsamkeiten (endogene PKC Aktivierung) nicht weiter zu verfolgen.

Das zweite wichtige Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen und Quellen intrazellulärer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu identifizieren. In den bisherigen Arbeiten wurde in diesem Zusammenhang meist die Untersuchung entweder indirekt oder an ruhenden Zellen untersucht. Unser Ziel war es nun, die Auswirkungen auf elektrisch stimulierte und somit arbeitende Zellen zu untersuchen. Dies ist insofern wichtig, da die mitochondriale ROS-Produktion

durch einen Elektronenfluss, der bei arbeitenden Zellen, an welchen die elektromechanische Kopplung greift, begünstigt wird. In unserem Versuch wurden zunächst Zellhomogenate von Meerschweinchen-Kardiomyozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucigenin inkubiert, welcher endogen gebildete Superoxidradikale durch Leuchten messbar macht. Das anschließend hinzugefügte NADPH, welches als Substrat der NADPH-Oxidase zu deren Aktivierung führt, zeigte einen deutlichen Anstieg der endogen gebildeten ROS. Somit konnte bereits festgelegt werden, dass die durch das Lucigenin gemessene angestiegene Menge an *light units*, welche als Maß für die gebildete Menge an ROS fungierten, tatsächlich diejenige Bildung an reaktiven Sauerstoffspezies misst, welche durch die NADPH-Oxidase gebildet werden. Wir fügten anschließend Apocynin zum Versuch dazu, mit der Idee, dass dieser als selektiver Inhibitor der NADPH-Oxidase fungiere. In unseren Ergebnissen zeigte sich durch Apocynin kein relevanter Abfall der gemessenen *light units*, sondern lediglich ein Sistieren der ROS-Produktion auf konstantem Niveau. Dies lässt sich damit erklären, dass neuere Studien zeigen, dass Apocynin nicht, wie lange Zeit angenommen, als Inhibitor der NADPH-Oxidase fungiert, sondern vielmehr ein generelles Antioxidationsmittel ist, welches die Fähigkeit besitzt, freie Radikale abzufangen und zu puffern⁴⁷. Durch die Hinzugabe des Apocynin fand also die durch NADPH induzierte Produktion von ROS an der NADPH-Oxidase weiterhin statt, jedoch wurde ein großer Teil dieser gebildeten freien Radikale durch das Apocynin abgefangen und gepuffert. Durch Applikation von Diphenyleniodinium (DPI) erst zeigte sich eine signifikante Reduktion der *light units* entsprechend der Menge an freien Radikalen. Dies erklären wir uns mit der Tatsache, dass DPI als Inhibitor der NADPH-Oxidase fungiert und damit die Produktion weiterer ROS durch die NADPH-Oxidase unterbindet. Das Apocynin für seinen Teil machte noch vorhandene freie Radikale durch seine Funktion als Antioxidans unschädlich.

Wir haben verschiedene Inhibitoren der NADPH-Oxidase anschließend miteinander verglichen, um die Stoffe herauszufiltern, welche die stärkste Eigenschaft besitzen, die NADPH-Oxidase zu hemmen und damit die ROS-Produktion zu unterbinden. Eines der Potentesten hierbei war das Diphenyleniodinium. Ähnlich ausgeprägte Eigenschaften besaß in unserem

Versuch nur noch das Tempol, welches ein membrangängiges Stickstoffmonoxid ist und als Radikalfänger fungiert und dessen positive Auswirkungen auf verschiedenste ROS-medierte Erkrankungen bereits mehrfach untersucht wurden^{67, 107}.

Wir haben als Fortführung des Versuchs mit Lucigenin inkubierte Kardiomyozyten vergleichsweise unter Normalbedingungen stimuliert, um die elektromechanische Kopplung auszulösen und anschließend unter Applikation von Endothelin (ET-1) sowie Angiotensin II (Ang II). ET-1 und Ang II binden jeweils an ET_A-bzw. AT₁-Rezeptoren, welche G_{q/11}-gesteuert die Phospholipase C aktivieren und damit die Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (InsP₃) initiieren¹⁰⁸. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC), welche durch Translokation verschiedener Isoenzyme wiederum zum einen die NADPH-Oxidase aktiviert und damit die ROS-Produktion initiiert, zum anderen durch mitochondriale Translokation der PKC_ε mitochondriale K_{ATP}-Kanäle aktiviert^{43, 55}. Weitere Daten deuten darauf hin, dass die durch AT₁-Rezeptoren vermittelte ROS-Produktion über die Aktivierung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle eine weitere ROS-Produktion hervorruft^{58, 59}.

Um die Quelle der gebildeten ROS weiter festzulegen, wurden die Kardiomyozyten zunächst unter Kontrollbedingungen stimuliert und die dabei entstandene Menge an ROS in *light units* bestimmt. Anschließend erfolgte derselbe Ablauf unter der Anwesenheit des PKC-Inhibitors Chelerythrine. Die Effekte des PKC-Inhibitors Chelerythrine wurden bereits in verschiedenen Arbeiten zur Klärung der Signalwege der PKC zum Einsatz gebracht^{44, 113}. Durch die Applikation des Chelerythrine konnten wir eine deutliche Reduktion der gemessenen *light units* und damit der gebildeten ROS auf mehr als die Hälfte beobachten. Dies lässt wiederum die Schlussfolgerung zu, dass ein bedeutender Teil der gebildeten freien Sauerstoffradikale durch die NADPH-Oxidase entstehen und diese wiederum über verschiedene Signalwege unter anderem über die Proteinkinase C aktiviert wird.

Wie weiter oben beschrieben, ist Diacylglycerol (DAG) ein Produkt der Phospholipase C, welches die Eigenschaft besitzt die Proteinkinase C zu

aktivieren. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) ist ein synthetisch hergestellter Phorbolester, welcher strukturelle Ähnlichkeit mit DAG aufweist und bereits in vielen Untersuchungen als DAG-Analogon eingesetzt wurde^{5, 74}. Wir haben daher den oben beschriebenen Versuch mit Chelerythrine erweitert und vergleichsweise statt dem PKC-Inhibitor Chelerythrine (CHE), den PKC-Aktivator PMA appliziert. Unter PMA konnte ein deutlicher Anstieg der freien Radikale (wiederum gemessen in *light units*) beobachtet werden, welcher im Vergleich dazu unter CHE nicht einmal halb so hoch war. Dies wiederum unterstreicht nochmal die Annahme, dass ein Großteil der bei unserem Versuch gemessenen freien Sauerstoffradikale durch die NADPH-Oxidase generiert wurde und deren Aktivierung durch die PKC erfolgte.

7. Quellenangaben

- 1 Aiello, E. A., Cingolani, H.E. and Villa-Abrille, M. C. (2002). "Autocrine stimulation of cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger currents by endogenous endothelin released by angiotensin II." Circ Res **90**(4): 374-376.
- 2 Aiello, E. A., Cingolani, H.E., Dulce, R. A. Perez N.G. and Villa-Abrille, M. C. (2005). "Endothelin-1 stimulates the Na^{+} / Ca^{2+} exchanger reverse mode through intracellular Na^{+} (Na^{+})-dependent and Na^{+} -independent pathways." Hypertension **45**(2): 288-293.
- 3 Akao, M., Marban, E. Ohler, A. and O'Rourke, B. (2001). "Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells." Circ Res **88**(12): 1267-1275.
- 4 Akar, F. G., Aon, M. A., O'Rourke, B. and Tomaselli, G. F. (2005). "The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias." J Clin Invest **115**(12): 3527-3535.
- 5 Al-Alem, L. F., Curry, T. E., Jr., Kilgore, M. W., McCord, L. A. and Southard, R. C. (2013). "Activation of the PKC Pathway Stimulates Ovarian Cancer Cell Proliferation, Migration, and Expression of MMP7 and MMP10." Biol Reprod **89**(3): 73.
- 6 Aon, M. A., Cortassa, S., O'Rourke, B. and Marban, E. (2003). "Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes." J Biol Chem **278**(45): 44735-44744.
- 7 Ariens, E. J. (1984). "Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology." Eur J Clin Pharmacol **26**(6): 663-668.
- 8 Armoundas, A. A., Hobai, I. A., O'Rourke, B., Tomaselli, G. F. and Winslow, R. L. (2003). "Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts." Circ Res **93**(1): 46-53.
- 9 Baartscheer, A., Belterman, C. N., Coronel, R., Fiolet, J. W. and Schumacher, C. A. (2003). "[Na^{+}]_i and the driving force of the Na^{+} / Ca^{2+} -exchanger in heart failure." Cardiovasc Res **57**(4): 986-995.
- 10 Baartscheer, A., Belterman, C. N., Coronel, R., Fiolet, J. W., Schumacher, C. A. and van Borren, M. M. (2003). "Increased Na^{+} / H^{+} -exchange activity is the cause of increased [Na^{+}]_i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model." Cardiovasc Res **57**(4): 1015-1024.
- 11 Baartscheer, A., Belterman, C. N., Coronel, R., Fiolet, J. W., Ophhof, T., Schumacher, C. A. and van Borren, M. M., (2005). "Chronic inhibition of Na^{+} / H^{+} -exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure." Cardiovasc Res **65**(1): 83-92.
- 12 Barton, M. and Davenport, A. P. (2012). "The Twelfth International Conference on Endothelin (ET-12), Cambridge 2011." Life Sci **91**(13-14): 462-465.
- 13 Bay, J., Kohlhaas, M. and Maack, C. (2013). "Intracellular Na^{+} and cardiac metabolism." J Mol Cell Cardiol **61**: 20-27.
- 14 Belch, J. J., Bridges, A. B., Chopra, M. and Scott, N. (1991). "Oxygen free radicals and congestive heart failure." Br Heart J **65**(5): 245-248.
- 15 Bendall, J. K., Cave, A. C., Gall, N., Heymes, C. and Shah, A. M. (2002). "Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice." Circulation **105**(3): 293-296.
- 16 Böhm, M. (2000). "Referenz-Reihe Kardiologie: Herzinsuffizienz." Thieme-Verlag: S. 35-39.
- 17 Bolli, R. and Marban, E. (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." Physiol Rev **79**(2): 609-634.
- 18 Borlaug, B. A. and Paulus, W. J. (2011). "Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment." Eur Heart J **32**(6): 670-679.

- 19 Borlaug, B. A. and Redfield, M. M. (2011). "Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum." Circulation **123**(18): 2006-2013; discussion 2014.
- 20 Bossuyt, J., Avkiran, M., Bers, D. M., Clements-Jewery, H., Haworth, R. S., Helmstadter, K., Martin, J. L., Pogwizd, S. M. and Wu, X. (2008). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure." Circ Res **102**(6): 695-702.
- 21 Cappola, T. P., Berger, R. D., Hare, J. M., Kass, D. A., Kobeissi, Z. A., Marban, E., Nelson, G. S. and Rosas, G. O. (2001). "Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." Circulation **104**(20): 2407-2411.
- 22 Carrasco, A. J., Abraham, M. R., Alekseev, A. E., Bienengraeber, M., Dzeja, P. P., Hodgson, D., Janssen, E., Pucar D., Pucaat, M., Terzic, A., Wieringa, B. and Zingman, L. V. (2001). "Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7623-7628.
- 23 Chen, Y., Bergem, S., Csordas, G., Csordas, N., Dorn, G. W., 2nd Jowdy, C., Kohlhaas, M., Liu, Y., Maack, C., Meiser, M., Nerbonne, J. M., Schneider, T. G. and Wang, W. (2012). "Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca²⁺ crosstalk." Circ Res **111**(7): 863-875.
- 24 Cingolani, H. E., Aiello, E. A., Abrille, M. C., Camilionde Hurtado, M. C., Cornelli, M., Correa, M. V., Ennis, I. L., Garciarena, C., Nolly, A., Suburo, A. M. and Villa- Torbidoni, V. (2006). "The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species." Hypertension **47**(4): 727-734.
- 25 Cortassa, S., Aon, M. A., Marban, E., O'Rourke, B. and Winslow, R. L. (2003). "An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics." Biophys J **84**(4): 2734-2755.
- 26 Cortassa, S., Aon, M. A., Jacques, R., Marban, E., O'Rourke, B., Tseng, H. J. and Winslow, R. L. (2006). "A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte." Biophys J **91**(4): 1564-1589.
- 27 Costa, A. D., Cohen, M. V., Downey, J. M., Garlid, K. D. and Pierre, S. V. (2008). "cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria." Cardiovasc Res **77**(2): 344-352.
- 28 Davenport, A. P. and Barton, M. (2013). "Themed section: endothelin." Br J Pharmacol **168**(2): 279-282.
- 29 Davis, B. R., Kostis, J. B., Black, H. R., Cushman, W. C., Einhorn, P. T., Farber, M. A., Ford, C. E., Group, A. C. R., Levy, D., Massie, B. M., Nawaz and S. Simpson, L. M. (2008). "Heart failure with preserved and reduced left ventricular ejection fraction in the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial." Circulation **118**(22): 2259-2267.
- 30 Despa, S., Bers, D. M., Islam, M. A., Pogwizd, S. M. and Weber, C. R. (2002). "Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged." Circulation **105**(21): 2543-2548.
- 31 Diaz-Velez, C. R., Garcia-Castineiras, S., Hernandez-Lopez, E. and Mendoza-Ramos, E. (1996). "Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure." Am Heart J **131**(1): 146-152.
- 32 Dulce, R. A., Alvarez, M. C., Caldiz, C., Camilion de Hurtado, M. C., Chiappe de Cingolani, G. E., Ennis, I. L., Garciarena, C. D., Hurtado, C., Pierce, G. N. and Portiansky, E. L. (2006). "Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: involvement of Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchangers." J Mol Cell Cardiol **41**(5): 807-815.

- 33 E. M. Abdel-Rahman, T. U., A. Schölkens "Angiotensin Vol. 2." Springer, Berlin, New York 2004 ISBN 3-540-40641-7.
- 34 Ekelund, U. E., Hare, J. M., Harrison, R. W., Kass, D. A., Marban, E., Senzaki, H., Shokek, O., Thakkar, R. N. and Tunin, R. S. (1999). "Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure." Circ Res **85**(5): 437-445.
- 35 Endoh, M. (2004). "Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 73-86.
- 36 Flesch, M., Bäumer, A. T., Böhm, M., Cremers, B., Maack, C. and Südkamp, M. (1999). "Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction." Circulation **100**(4): 346-353.
- 37 Fonarow, G. C., Abraham, W. T., Albert, N. M., Gheorghiade, M., Greenberg, B. H., O'Connor, C. M., Stough, W. G., Sun, J. L., Yancy, C. W., Young, J. B., Investigators, O.-H. and Hospitals (2007). "Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry." J Am Coll Cardiol **50**(8): 768-777.
- 38 Gao, W. D., Liu, Y. and Marban, E. (1996). "Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium." Circulation **94**(10): 2597-2604.
- 39 Gardner, P. R., Epstein, L. B., Raineri, I. and White, C. W. (1995). "Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells." J Biol Chem **270**(22): 13399-13405.
- 40 Giordano, F. J. (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." J Clin Invest **115**(3): 500-508.
- 41 Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- 42 Halestrap, A. (2005). "Biochemistry: a pore way to die." Nature **434**(7033): 578-579.
- 43 Hanley, P. J. and Daut, J. (2005). "K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms." J Mol Cell Cardiol **39**(1): 17-50.
- 44 Harmati, G., Banyasz, T., Barandi, L., Horvath, B., Krasznai, Z., Magyar, J., Nanasi, P., P. Panyi, G., Papp, F., Ruzsnavszky, F. and Szentandrassy, N. (2011). "Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K⁺ currents." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **383**(2): 141-148.
- 45 Hasenfuss, G. and Pieske, B. (2002). "Calcium cycling in congestive heart failure." J Mol Cell Cardiol **34**(8): 951-969.
- 46 Heinzl, F. R., Boengler, K., de Groot, H., Di Lisa, F., Dodoni, G., Heusch, G., Luo, Y., Petrat, F. and Schulz, R. (2006). "Formation of reactive oxygen species at increased contraction frequency in rat cardiomyocytes." Cardiovasc Res **71**(2): 374-382.
- 47 Heumüller, S., Barbosa-Sicard, E., Brandes, R. P., Busse, R., Schmidt, H. H., Schröder, K. and Wind, S. (2008). "Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant." Hypertension **51**(2): 211-217.
- 48 Hoch, B., Hetzer, R., Karczewski, P., Krause, E. G. and Meyer, R. (1999). "Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium." Circ Res **84**(6): 713-721.
- 49 Houser, S. R. and Margulies, K. B. (2003). "Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure?" Circ Res **92**(4): 350-358.
- 50 Hunt, S. A., Abraham, W. T., Chin, M. H., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Jessup, M., Konstam, M. A., Mancini, D. M., Michl, K., Oates, J. A., Rahko, P. S., Silver, M.

- A., Stevenson, L. W. and Yancy, C. W. (2009). "2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation." Circulation **119**(14): e391-479.
- 51 Ide, T., Egashira, K., Hayashidani, S., Ichikawa, K., Kinugawa, S., Machida, Y., Suematsu, N., Takeshita, A., Tsutsui, H. and Utsumi, H. (2000). "Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium." Circ Res **86**(2): 152-157.
- 52 Ide, T., Arimura, K., Egashira, K., Hattori, N., Kang, D., Kinugawa, S., Takeshita, A., Tsutsui, H., Uchida, K. and Utsumi, H. (1999). "Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium." Circ Res **85**(4): 357-363.
- 53 IonOptix "Myocyte Calcium & Contractility Recording System " User's guide.
- 54 Ito, H., Adachi, S., Hirata, Y., Hiroe, M., Koike, A., Murumo, F., Nogami, A., Tanaka, M. and Tsujino, M. (1993). "Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes." J Clin Invest **92**(1): 398-403.
- 55 Jaburek, M., Burton, J. R., Costa, A. D., Costa, C. L. and Garlid, K. D. (2006). "Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes." Circ Res **99**(8): 878-883.
- 56 Kaczmarek, I., Beiras-Fernandez, A., Grininger, C., Hagl, C., Meiser, B., Nickel, T., Reimann, R., Sadoni, S. and Zaruba, M. M. (2013). "Tacrolimus with mycophenolate mofetil or sirolimus compared with calcineurin inhibitor-free immunosuppression (sirolimus/mycophenolate mofetil) after heart transplantation: 5-year results." J Heart Lung Transplant **32**(3): 277-284.
- 57 Kim, S. J., Colantonio, D. A., Honda, R., Kim, Y. K., Kudej, R. K., Rasmusson, R. L., Takagi, G., Van Eyk, J. E., Vatner, D. E., Vatner, S. F. and Yatani, A. (2001). "A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca²⁺ handling." Circ Res **89**(9): 831-837.
- 58 Kimura, S., Abe, Y., Fan, Y. Y., Nishiyama, A., Rahman, M., Shokoji, T., Yao, L. and Zhang, G. X. (2005). "Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide." Hypertension **45**(3): 438-444.
- 59 Kimura, S., Abe, Y., Fan, Y. Y., Maeta, H., Nishiyama, A., Rahman, M., Shokoji, T., Suzuki, T., Yao, L. and Zhang, G. X., (2005). "Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II." Hypertension **45**(5): 860-866.
- 60 Kirchhefer, U., Neumann, J., Schmitz, W. and Scholz, H. (1999). "Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts." Cardiovasc Res **42**(1): 254-261.
- 61 Kohlhaas, M., Böhm, M., Knopp, A., Liu, T., Maack, C., Ong, M. F., O'Rourke, B. and Zeller, T. (2010). "Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes." Circulation **121**(14): 1606-1613.
- 62 Kohlhaas, M., Böhm, M., Knopp, A., Liu, T., Maack, C., Ong, M. F., O'Rourke, B. and Zeller, T. (2010). "Elevated cytosolic sodium increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes." Circulation (in press).
- 63 Kohlhaas, M. and Maack, C. (2010). "Adverse bioenergetic consequences of Na⁺-Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ influx in cardiac myocytes." Circulation **122**(22): 2273-2280.
- 64 Kohlhaas, M. and Maack, C. (2013). "Calcium release microdomains and mitochondria." Cardiovasc Res **98**(2): 259-268.

- 65 Kramer, B. K., Kelly, R. A. and Smith, T. W. (1991). "Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H+ exchanger." Circ Res **68**(1): 269-279.
- 66 Lehnart, S. E., Marks, A. R. and Wehrens, X. H. (2005). "Defective ryanodine receptor interdomain interactions may contribute to intracellular Ca²⁺ leak: a novel therapeutic target in heart failure." Circulation **111**(25): 3342-3346.
- 67 Lim, J. H., Chang, Y. S., Chung, S., Lee, J. H., Kim, M. Y., Kim, Y. S., Park, C. W., Yoo, H. J., Yoon, H. H. and Youn, D. Y. (2013). "Aggravation of diabetic nephropathy in BCL-2 interacting cell death suppressor (BIS)-haploinsufficient mice together with impaired induction of superoxide dismutase (SOD) activity." Diabetologia.
- 68 Liu, F., Chen, L., de Serrano, V., Esaki, S., Fu, R., Liu, A. and Rehmani, I. (2013). "Pirin is an iron-dependent redox regulator of NF-kappaB." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9722-9727.
- 69 Lloyd-Jones, D. M., Beiser, A., D'Agostino, R. B., Benjamin, E. J., Kannel, W. B., Larson, M. G., Leip, E. P., Levy, D., Murabito, J. M. and Vasan, R. S. (2002). "Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study." Circulation **106**(24): 3068-3072.
- 70 Maack, C., Aon, M. A., Cortassa, S., Ganesan, A. N., Liu, T. and O'Rourke, B. (2006). "Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes." Circ Res **99**(2): 172-182.
- 71 Maack, C., Böhm, M., Dabew, E. R., Hohl, M. and Schäfers, H. J. (2009). "Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning." Circ Res **105**(8): 811-817.
- 72 Maack, C., Böhm, M., Kartes, T., Kilter, H., Laufs, U., Nickenig, G. and Schäfers, H. J. (2003). "Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment." Circulation **108**(13): 1567-1574.
- 73 Maack, C. and O'Rourke, B. (2007). "Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics." Basic Res Cardiol **102**(5): 369-392.
- 74 Macrae, K., Baranowski, M., Blachnio-Zabielska, A., Gorski, J., Hundal, H. S., Lipina, C., Marley, A. and Stretton, C. (2013). "Defining the role of DAG, mitochondrial function, and lipid deposition in palmitate-induced proinflammatory signaling and its counter-modulation by palmitoleate." J Lipid Res **54**(9): 2366-2378.
- 75 Mallat, Z., Chatel, D., Lebret, M., Maclouf, J. Philip, I. and Tedgui, A. (1998). "Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure." Circulation **97**(16): 1536-1539.
- 76 Mubagwa, K., Bosteels, S., Flameng, W., Lin, W. and Sipido, K. (1997). "Monensin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction." J Mol Cell Cardiol **29**(3): 977-989.
- 77 Murphy, E. and Eisner, D. A. (2009). "Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease." Circ Res **104**(3): 292-303.
- 78 Narula, J., Dec, G. W., DiSalvo, T. G., Haider, N., Hajjar, R. J., Khaw, B. A., Kolodgie, F. D., Schmidt, U., Semigran, M. J. and Virmani, R. (1996). "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure." N Engl J Med **335**(16): 1182-1189.
- 79 Neher, E. and Sakmann, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

- 80 Neubauer, S. (2007). "The failing heart--an engine out of fuel." N Engl J Med **356**(11): 1140-1151.
- 81 Neumann, T., Biermann, J., Dietz, R., Erbel, R., Ertl, G., Neumann, A. and Wasem, J. (2009). "Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives." Dtsch Arztebl Int **106**(16): 269-275.
- 82 Nickel, A., Löffler, J. and Maack, C. (2013). "Myocardial energetics in heart failure." Basic Res Cardiol **108**(4): 358.
- 83 Numberger, M. and Draguhn, A. (1996). "Patch-Clamp Technik." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- 84 O'Rourke, B. and Maack, C. (2007). "The role of Na dysregulation in cardiac disease and how it impacts electrophysiology." Drug Discov Today Dis Models **4**(4): 207-217.
- 85 Ogden, D. (1994). Microelectrode techniques : the Plymouth Workshop handbook. Cambridge, Company of Biologists.
- 86 Page, I. H. and Helmer, O. M. (1940). "A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator." J Exp Med **71**(1): 29-42.
- 87 Petrat, F., de Groot, H., Kirsch, M. and Pindiur, S. (2003). "NAD(P)H, a primary target of 102 in mitochondria of intact cells." J Biol Chem **278**(5): 3298-3307.
- 88 Piacentino, V., 3rd, Bers, D. M., Chen, X., Houser, S. R., Margulies, K. B., Weber, C. R. and Weisser-Thomas, J. (2003). "Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes." Circ Res **92**(6): 651-658.
- 89 Pieske, B., Beyermann, B., Breu, V., Hasenfuss, G., Just, H., Löffler, B. M., Maier, L. S., Schlotthauer, K. and Schmidt-Schweda, S. (1999). "Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium." Circulation **99**(14): 1802-1809.
- 90 Pieske, B. and Houser, S. R. (2003). "[Na⁺]_i handling in the failing human heart." Cardiovasc Res **57**(4): 874-886.
- 91 Pieske, B., Hasenfuss, G., Houser, S., Maier, L. S., Piacentino, V., 3rd, and Weisser, J. (2002). "Rate dependence of [Na⁺]_i and contractility in nonfailing and failing human myocardium." Circulation **106**(4): 447-453.
- 92 Pogwizd, S. M., Bers, D. M., Sipido, K. R. and Verdonck, F. (2003). "Intracellular Na in animal models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis." Cardiovasc Res **57**(4): 887-896.
- 93 Renz-Polster, H., Braun, J. and Krautzig, S. (2004). "Basislehrbuch Innere Medizin." **3. Auflage**: S. 86-96.
- 94 Roger, V. L., Hellermann-Homan, J. P., Jacobsen, S. J., Killian, J., Redfield, M. M., Weston, S. A. and Yawn, B. P. (2004). "Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population." JAMA **292**(3): 344-350.
- 95 Rydstrom, J. (2006). "Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 721-726.
- 96 Sack, S., Dargès, N., Erbel, R., Heinzl, F. and Wieneke, H. (2001). "[Cardiac resynchronization therapy in terminal heart failure: current status and prospects]." Herz **26**(1): 84-88.
- 97 Sager, G., Bessesen, A., Jacobsen, S. and Sandnes, D. (1985). "Adrenergic ligand binding in human serum." Biochem Pharmacol **34**(15): 2812-2815.
- 98 Sager, P. T., Follmer, C., Godfrey, R., Pruitt, C. and Uppal, P. (1994). "The effects of beta-adrenergic stimulation on the frequency-dependent electrophysiologic actions of amiodarone and sotalolol in humans." Circulation **90**(4): 1811-1819.
- 99 SantaCruzBiotechnologyInc. "Product Block Lucigenin " www.scbio.de.
- 100 SigmaAldrich "Produktdatenblatt Apocynin." www.sigmaaldrich.com.

- 101 SigmaAldrich "Produktdatenblatt Chelerythine." www.sigmaaldrich.com.
- 102 SigmaAldrich "Produktdatenblatt DPI." www.sigmaaldrich.com.
- 103 SigmaAldrich "Produktdatenblatt FURA-2." www.sigma-aldrich.
- 104 SigmaAldrich "Produktdatenblatt INDO-1 AM." www.sigmaaldrich.com.
- 105 SigmaAldrich "Produktdatenblatt Phorbol-12-Myristat-13-Acetat" www.sigmaaldrich.com.
- 106 Sipido, K. R. and Wier, W. G. (1991). "Flux of Ca^{2+} across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling." *J Physiol* **435**: 605-630.
- 107 Sousa-Santos, O., Ferraz, K. C., Neto-Neves, E. M., Portella, R. L., Sertorio, J. T. and Tanus-Santos, J. E. (2013). "The antioxidant tempol decreases acute pulmonary thromboembolism-induced hemolysis and nitric oxide consumption." *Thromb Res*.
- 108 Sugden, P. H. (2003). "An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte." *J Mol Cell Cardiol* **35**(8): 871-886.
- 109 Sutsch, G. and Barton, M. (1999). "Endothelin in heart failure." *Curr Hypertens Rep* **1**(1): 62-68.
- 110 Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P. and Marban, E. (2003). "Cariporide (HOE642), a selective Na^{+} - H^{+} exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway." *Circulation* **108**(18): 2275-2281.
- 111 Tian, R., Camacho, S. A., Dillmann, W. H., Figueredo, V. M., Halow, J. M., Ingwall, J. S. and Meyer, M. (1998). "Thermodynamic limitation for Ca^{2+} handling contributes to decreased contractile reserve in rat hearts." *Am J Physiol* **275**(6 Pt 2): H2064-2071.
- 112 Valdivia, C. R., Chu, W. W., Foell, J. D., Haworth, R. A., Kamp, T. J., Makielski, J. C., Pu, J. and Wolff, M. R. (2005). "Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart." *J Mol Cell Cardiol* **38**(3): 475-483.
- 113 von Stebut, E., Amon, U., Herbert, J. M. and Wolff, H. H. (1994). "Investigations with the selective PKC inhibitor chelerythrine on human basophils." *Agents Actions* **41 Spec No**: C56-57.
- 114 Wagner, S., Bers, D. M., Brown, J. H., Dybkova, N., Fabritz, L., Hasenfuss, G., Jacobshagen, C., Kirchhof, P., Maier, L. S., Maier, S. K., Rasenack, E. C. and Zhang, T., (2006). " Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels." *J Clin Invest* **116**(12): 3127-3138.
- 115 Weber, C. R., Bers, D. M., Houser, S. R. and Piacentino, V., 3rd (2003). "Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure." *Circulation* **108**(18): 2224-2229.
- 116 Weisser-Thomas, J., Gaughan, J. P., Houser, S. R., Margulies, K. and Piacentino, V., 3rd (2003). "Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes." *Cardiovasc Res* **57**(4): 974-985.
- 117 Wencker, D., Armstrong, R. C., Chandra, M., Factor, S. M., Garantziotis, S., Kitsis, R. N., Miao, W., Nguyen, K. and Shirani, J. (2003). "A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure." *J Clin Invest* **111**(10): 1497-1504.
- 118 Ying, W. (2008). "NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences." *Antioxid Redox Signal* **10**(2): 179-206.
- 119 Zarain-Herzberg, A. (2006). "Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in the hypertrophic and failing heart." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(5): 509-521.
- 120 Zarain-Herzberg, A. (2004). "Transcriptional regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and calsequestrin genes in cardiac myocytes." *J Muscle Res Cell Motil* **25**(8): 609-610.

- 121 Zarain-Herzberg, A., Estrada-Aviles, R. and Fragoso-Medina, J. (2012). "Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin gene expression in the heart." Can J Physiol Pharmacol **90**(8): 1017-1028.
- 122 Zeitz, O., Hasenfuss, G., Hensmann, G., Janssen, P. M., Kogler, H., Maass, A. E., Moller, K. and Van Nguyen, P. (2002). "Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange." Circ Res **90**(9): 988-995.
- 123 Zhang, Y., Davies, K. J., Ernster, L., Giulivi, C. and Marcillat, O. (1990). "The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase." J Biol Chem **265**(27): 16330-16336.
- 124 Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Sollott, S. J. and Zweier, J. L. (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med **192**(7): 1001-1014.

8. Danksagung

Ich danke herzlichst all denen, die während der Zeit der Erstellung dieser Dissertation mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, mich unterstützt und gefördert haben, mir zu jeder Zeit eine Hilfe waren und an mich geglaubt haben.

9. Eigene Veröffentlichungen/Arbeiten

Poster bei der 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie:

Konstitutive Aktivität des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals schützt menschliches insuffizientes Myokard vor Hydroxylradikal-induzierter kontraktiler Dysfunktion

C. Maack, E. Dabew, M. Hohl, A. A. Cura, T. Zeller, H.-J. Schäfers, M. Böhm.

Abstract 3616 in Circulation, 2009; 120: S837, American Heart Association:

Endogenous Activation of Mitochondrial K_{ATP} Channels Protects Human Failing Myocardium From Hydroxyl Radical-induced Stunning

Christoph Maack, Ewtim R Dabew, Mathias Hohl, Astrid A Cura, Tanja Zeller, Hans-Joachim Schäfers, Michael Böhm.